

SKRIPSI

SINTESIS SENYAWA ASAM 2-(4-KLOROBENZOILOKSI)-5-METOKSI BENZOAT DAN UJI AKTIVITAS ANALGESIKNYA PADA MENCIT (*Mus musculus*)



FAUZIAH RAHMAWATI

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
DEPARTEMEN KIMIA FARMASI
SURABAYA**

2016

SKRIPSI

**SINTESIS SENYAWA ASAM
2-(4-KLOBENZOILOKSI)-5-METOKSI BENZOAT
DAN UJI AKTIVITAS ANALGESIKNYA PADA
MENCIT (*Mus musculus*)**

The logo of Universitas Airlangga is a large, circular emblem. It features a central blue circle with a white bird (Garuda) holding a red and white shield. The bird is surrounded by a yellow ring with a repeating pattern. The entire emblem is set against a light yellow background.

**FAUZIAH RAHMAWATI
NIM. 051211131022**

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
DEPARTEMEN KIMIA FARMASI
SURABAYA
2016**

**LEMBAR PERSETUJUAN
PUBLIKASI KARYA ILMIAH**

Demi perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui skripsi / karya ilmiah saya dengan judul :

**SINTESIS SENYAWA ASAM 2-(4-KLOROBENZOILOKSI)-5-METOKSI BENZOAT DAN UJI AKTIVITAS ANALGESIKNYA
PADA MENCIT (*Mus musculus*)**

untuk dipublikasikan atau ditampilkan dalam internet atau media lain yaitu *Digital Library* Perpustakaan Universitas Airlangga untuk kepentingan akademik sebatas sesuai dengan Undang-Undang Hak Cipta.

Demikian surat pernyataan persetujuan publikasi karya ilmiah saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 8 Agustus 2016



051211131022

SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini,

Nama : Fauziah Rahmawati

NIM : 051211131022

Fakultas : Farmasi

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa hasil tugas akhir yang saya tulis dengan judul:

SINTESIS SENYAWA ASAM 2-(4-KLOROBENZOILOKSI)-5-METOKSI BENZOAT DAN UJI AKTIVITAS ANALGESIKNYA PADA MENCIT (*Mus musculus*)

adalah benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri. Apabila dikemudian hari diketahui bahwa skripsi ini merupakan hasil plagiarism, maka saya bersedia menerima sanksi berupa pembatalan kelulusan dan atau pencabutan gelar yang saya peroleh.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 8 Agustus 2016



051211131022

Lembar Pengesahan

**SINTESIS SENYAWA ASAM
2-(4-KLOROBENZOILOKSI)-5-METOKSI BENZOAT
DAN UJI AKTIVITAS ANALGESIKNYA PADA
MENCIT (*Mus musculus*)**

SKRIPSI

**Untuk Memenuhi Syarat Mencapai Gelar Sarjana Farmasi
Pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
2016**

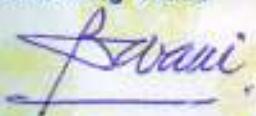
Oleh :

FAUZIAH RAHMAWATI

NIM : 051211131022

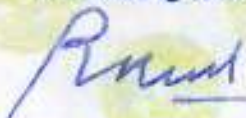
Telah disetujui oleh :

Pembimbing Utama



Dr. Bambang Tri Purwanto, M.S., Apt.
NIP. 19571006 198503 1003

Pembimbing Serta



Prof. Dr. H. Purwanto, Apt.
NIP. 19470730 197603 1001

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT, kerana berkat rahmat dan hidayah-Nya maka penelitian dengan judul **Sintesis Senyawa Asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat Dan Uji Aktivitas Analgesiknya Pada Mencit (*Mus musculus*)** dapat diselesaikan.

Bersama ini penulis mengucapkan terima kasih dengan hati yang tulus kepada:

1. Bapak Dr. Bambang Tri Purwanto, Apt.,MS dan Bapak Prof. Dr. H. Purwanto, Apt selaku dosen pembimbing yang telah berkenan meluangkan waktu, pikiran dan tenaga untuk membimbing dan mencurahkan ilmunya serta memberikan motivasi dalam meyelesaikan skripsi ini.
2. Bapak Prof. Dr. M Zainuddin, Apt dan Ibu Dra. Suzana, Apt.,MSi selaku dosen penguji yang telah berkenan membimbing, memeriksa dan memberikan saran pada skripsi ini.
3. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya yang juga merupakan dosen wali dari penulis, Dr. Umi Athiyah, Apt.,MS atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama penulis menjalani pendidikan sampai melaksanakan penelitian serta motivasi, dukungan, dan masukan pada penulis di tengah-tengah kesibukan dalam menjalankan tugas sebagai dekan.

4. Seluruh dosen yang telah ikhlas mencurahkan tenaga dalam menyampaikan ilmu kepada penulis, tenaga non pendidik, pak miskun, yang telah membantu memfasilitasi proses belajar di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
5. Kedua orang tua penulis Ayah H.Ahmad Munif dan Ibu Nur Azizah serta adik kandung M.Tufiqurrahman atas doa yang setiap hari dipanjatkan untuk penulis. Terima kasih atas curahan kasih sayang yang tidak pernah ada habisnya lewat motivasi, kritik, saran dan dukungan dalam berbagai hal pada kehidupan ini.
6. Sahabat-sahabat tersayang penulis: Ade Fili Sophia dan Putri Kusniawati atas semua pengalaman dan pembelajaran hidup di saat senang atau susah selama 4 tahun ini. Meta Dian F, Desy Ermawati, Roudlotul Jannah, Renisa Azalia, Liga Riskya P, Krisma Agung, Satrio W, Dhita Amalina, terima kasih atas kebahagiaan karena canda dan tawa di masa kuliah.
7. Semua teman-teman kesayangan kelas C angkatan 2012. Terima kasih atas dukungan di kala penulis mengalami masalah.
8. Teman-teman seperjuangan skripsi di Laboratorium Kimia Medisinal: Pili, PK, Vagen, Vivi, Ega, Yunita, Satrio, Can, Romce, Faseh, dan Nitiya.
9. Sahabat lama penulis sejak sekolah: Ariesa Putri, Puspita F, Aisyah F, Febriana K, Novinda S, Dwi Yanuar.
10. Teman-teman angkatan 2012, Amoksilin.
11. Karyawan laboratorium di Lab. Kimia Medisinal, Kimia Sintesis, dan Kimia Analisis. Serta semua pihak yang tidak

dapat disebutkan satu-persatu atas bantuan untuk menyelesaikan skripsi ini.

Semoga Allah SWT membalas budi baik semua pihak yang telah memberi kesempatan, dukungan dan bantuan dalam menyelesaikan skripsi ini. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, tetapi penulis berharap semoga skripsi ini bermanfaat bagi pengembangan keilmuan.



Surabaya, 8 Agustus 2016

Fauziah Rahmawati

RINGKASAN**SINTESIS SENYAWA ASAM 2-(4-KLOROBENZOILOKSI)-5-METOKSI BENZOAT DAN UJI AKTIVITAS ANALGESIKNYA
PADA MENCIT (*Mus musculus*)**

FAUZIAH RAHMAWATI

Nyeri merupakan perasaan sensoris dan emosional yang tidak nyaman serta bersifat subyektif. Penggunaan obat anti nyeri (analgetika) yang hingga saat ini masih digunakan adalah aspirin atau asam asetil salisilat yang merupakan turunan asam salisilat. Dalam usaha untuk mendapatkan senyawa baru turunan asam salisilat dengan aktivitas yang lebih besar, maka dilakukan modifikasi molekul dengan cara mensintesis senyawa baru yaitu senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat.

Sintesis senyawa dilakukan dengan menggunakan prinsip reaksi esterifikasi dengan mereaksikan antara senyawa asam 5-metoksi salisilat dengan 4-klorobenzoil klorida dan pelarut THF dan katalis piridin. Randemen dalam sintesis ini sebesar 44%. Senyawa hasil sintesis diuji kemurnian dengan penentuan jarak lebur dan kromatografi lapis tipis (KLT). Jarak lebur senyawa hasil sintesis adalah 192-193°C yang berbeda dengan senyawa asal yaitu asam-5-metoksi salisilat. Pengujian dengan KLT pada 3 macam campuran eluen yang berbeda juga menunjukkan perbedaan harga R_f bila dibandingkan dengan senyawa asal yaitu Asam-5-metoksi salisilat. Konfirmasi struktur dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer Inframerah untuk mengetahui gugus fungsi dari senyawa hasil sintesis, spektrofotometer uv-vis untuk mengetahui adanya pergeseran gelombang yang merujuk pada penambahan gugus kromofor tertentu, serta spektroskopi resonansi inti magnet (¹H-NMR) untuk mapping atom H dalam senyawa hasil sintesis. Berdasarkan ketiga alat pendukung tersebut maka dapat disimpulkan bahwa senyawa hasil sintesis berbeda dengan senyawa asal yaitu asam-5-metoksi salisilat.

Uji aktivitas analgesik senyawa uji yaitu senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat maupun senyawa pembanding yang dalam hal ini adalah asam asetil salisilat diberikan secara intraperitoneal dalam dosis 25 mg/kgBB, 50 mg/kgBB, dan 100 mg/kgBB pada 20 menit

sebelum injeksi asam asetat 0,6% untuk mengoptimalkan absorpsi senyawa uji atau pembanding oleh hewan coba. Pengamatan kemudian dilakukan selama 30 menit setelah 5 menit larutan asam asetat diinjeksikan. Aktivitas analgesik dapat dihitung dari frekuensi geliat mencit berdasarkan presentase hambat nyeri. Pada kelompok senyawa uji dosis 25 mg/kgBB, didapatkan harga persen hambat nyeri sebesar 30,86% dan untuk dosis 50 mg/kgBB serta 100 mg/kgBB masing-masing adalah 44,26% dan 60,53%. Sedangkan persen hambat nyeri kelompok pembanding asam asetil salisilat atau asetosal pada dosis 25 mg/kgBB didapatkan harga 19,38% dan pada dosis 50 mg/kgBB serta 100 mg/kgBB masing-masing adalah 32,78% dan 58,13%. Berdasarkan hasil ini dapat disimpulkan bahwa senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat memiliki aktivitas analgesik yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan asam asetil salisilat atau asetosal.



ABSTRACT

SYNTHESIS AND ANALGESIC ACTIVITY TEST OF 2-(4-CHLOROBENZOYLOXY)-5-METHOXY BENZOIC ACID IN MICE
(Mus musculus)

Fauziah Rahmawati

Molecular modification is a method that can be done to obtain new compound with greater activity. A salicylic acid derivative, 2-(4-chlorobenzoyloxy)-5-methoxy benzoic acid was synthesized and tested for analgesic activities. Synthesis of this compound based on esterification reaction by Schotten-Baumann. Its purity was screened by melting point test and Thin Layer Chromatography. UV-Vis Spectrophotometry, Infrared Spectrophotometry, and H-NMR Spectrometry used for confirming the structure of the new compound. In writhing test method, 2-(4-chlorobenzoyloxy)-5-methoxy benzoic acid was comparing to the standard reference drug, acetyl salicylic acid at equidose and also the control (CMC-Na suspension 0,5%). One way ANOVA showed that there was significant difference from the frequency of writhing in mice between groups of new compound, acetyl salicylic acid, and the control. Efficiency dose (ED_{50}) of 2-(4-chlorobenzoyloxy)-5-methoxy benzoic acid is 62,52 mg/kg body weight while Asetosal is 80,28 mg/kg body weight. It showed that 2-(4-chlorobenzoyloxy)-5-methoxy benzoic acid has higher analgesic activity than acetyl salicylic acid.

Keyword: synthesis, 2-(4-chlorobenzoyloxy)-5-methoxy benzoic acid, analgesic activity, Efficiency dose (ED_{50})

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL.....	ii
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI ILMIAH	iii
HALAMAN PERNYATAAN BUKAN HASIL PLAGIARISME	iv
LEMBAR PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
RINGKASAN.....	ix
<i>ABSTRACT</i>	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR.....	xix
DAFTAR SINGKATAN	xxii
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian.....	7
1.4 Manfaat Penelitian.....	8
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tinjauan tentang sintesis	9
2.2 Analgetika	9
2.3 Asam asetil salisilat.....	10
2.4 Tinjauan tentang nyeri.....	11
2.5 Tinjauan tentang Esterifikasi.....	12
2.6 Tinjauan Bahan	13
2.6.1 Asam 5-metoksi salisilat.....	13

2.6.2	4-Klorobenzoil Klorida	14
2.6.3	Tetrahidrofuran.....	14
2.6.4	FeCl ₃ (Ferri Klorida)	15
2.6.5	Metanol.....	15
2.6.6	Piridin.....	16
2.7	Tinjauan tentang Sintesis Senyawa Asam 2-(4-Klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat	16
2.8	Tinjauan Tahap Penentuan Senyawa Hasil Sintesis	18
2.8.1.	Tinjauan tentang Penentuan Jarak Lebur.....	18
2.8.2.	Tinjauan tentang Kromatografi Lapis Tipis	18
2.8.3.	Tinjauan tentang Ultra Violet <i>Visible</i> (UV-Vis). ..	19
2.8.4.	Tinjauan tentang spektrofotometri Inframerah... ..	20
2.8.5.	Tinjauan tentang Spektrometri Resonansi Magnet Inti (¹ HNMR)	20
2.9.	Metode Pengujian Aktivitas Analgesik	21
2.9.1	Metode Pengujian Aktivitas Analgesik Sentral	21
2.9.1.1	Metode <i>HAFFNER's Tail Clip</i>	21
2.9.1.2	Metode <i>Tail Flick</i>	22
2.9.1.3	Metode <i>Hot Plate</i>	22
2.9.1.4	Metode <i>Tail Immeersion Test</i>	22
2.9.1.5	Metode Stimulasi Listrik	23
2.9.2	Metode Pengujian Aktivitas Analgesik Perifer	23
2.9.2.1	Metode <i>Writhing Test</i>	23
2.9.2.2	Metode <i>RANDALL SELITTO-Test In Rats</i>	24
BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL		
3.1	Kerangka Konseptual	25
3.2	Skema Kerangka Konseptual	27

3.3	Hipotesis.....	28
BAB IV. METODOLOGI PENELITIAN		
4.1	Rancangan Penelitian	29
4.2	Bahan Penelitian.....	30
4.1.1	Bahan Kimia.....	30
4.1.2	Hewan Coba	31
4.3	Alat.....	31
4.4	Kerangka Operasional Sintesis.....	32
4.5	Prosedur Sintesis Senyawa Asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat.....	33
4.6	Analisis Senyawa Asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat	35
4.6.1	Pemeriksaan Organoleptis.....	35
4.6.2	Pemeriksaan Kemurnian Senyawa dengan Titik Lebur	35
4.6.3	Konfirmasi Struktur Senyawa dengan Kromatografi Lapis Tipis.....	36
4.6.4	Konfirmasi Struktur dengan UV-Vis	36
4.6.5	Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer <i>Fourier-Infrared</i>	37
4.6.6	Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer Resonansi Magnet Inti (H^1 -NMR)	37
4.7	Uji Aktivitas Analgesik.....	37
4.7.1	Perhitungan Jumlah Hewan Coba	38
4.7.2	Persiapan Hewan Coba	39
4.7.3	Pembuatan Larutan Asam Asetat 0,6%.....	39
4.7.4	Pembuatan Mucilago CMC-Na 0,5%	39

4.7.5	Perhitungan Dosis	40
4.7.6	Pembuatan Sediaan Senyawa Uji	41
4.7.7	Pemberian Senyawa Uji	42
4.7.8	Pelaksanaan Uji Aktivitas	43
4.8	Analisa Data	43
BAB V. HASIL PENELITIAN		
5.1	Hasil Sintesis Senyawa Asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat.....	47
5.2	Analisis Senyawa Hasil Sintesis	47
5.2.1	Pemeriksaan Organoleptis	47
5.2.2	Uji Pemeriksaan Kemurnian	48
5.2.2.1	Penentuan Titik Lebur	48
5.2.2.2	Pemeriksaan Kemurnian dengan KLT.....	48
5.3	Konfirmasi Struktur	49
5.3.1	Konfirmasi Struktur dengan Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	49
5.3.2	Konfirmasi Struktur dengan Menggunakan Spektrofotometer Inframerah	51
5.3.3	Konfirmasi Struktur dengan Menggunakan Spektrometer Resonansi Magnet Inti ($^1\text{H-NMR}$) ...	55
5.4	Uji Aktivitas Analgesik	57
5.4.1	Penentuan Frekuensi Geliat (Respon Nyeri)	57
5.4.2	Analisis Data dengan Uji ANOVA	58
5.4.3	Perhitungan % Hambat Nyeri.....	59
BAB VI. PEMBAHASAN		62
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN		70
DAFTAR PUSTAKA		71

LAMPIRAN	75
----------------	----



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel IV.1. Konversi Dosis Hewan Coba ke HED Berdasarkan BSA	40
Tabel V.1. Hasil Pemeriksaan Organoleptis	47
Tabel V.2. Hasil Pemeriksaan Jarak Lebur	48
Tabel V.3. Nilai Rf Senyawa Asam 5-metoksi Salisilat dan Asam 2-(benzoiloksi)-5-metoksi Benzoat	49
Tabel V.4. Karakteristik Spektrum Inframerah Senyawa Asam 5-metoksi Salisilat dan Senyawa hasil sintesis yaitu Asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi Benzoat	53
Tabel V.5. Karakteristik Spektrum ¹ H-NMR Senyawa Asam 5-metoksi Salisilat.....	56
Tabel V.6. Karakteristik Spektrum ¹ H-NMR Asam 2-(4-Klorobenzoiloksi)-5-metoksi Benzoat	57
Tabel V.7. Frekuensi Geliat Mencit pada Kelompok Senyawa Uji Asam 2-(4-Klorobenzoiloksi)-5-metoksi Benzoat dan Kelompok Senyawa Pembanding Asetosal dalam suspensi CMC-Na, Kelompok Kontrol CMC-Na 0.5%	58
Tabel V.8. Persen Hambat Nyeri Senyawa Pembanding Asam asetil salisilat dan Senyawa uji yaitu Asam 2-(4-Klorobenzoiloksi)-5-metoksi Benzoat	60

Tabel V.9. Harga ED ₅₀ Senyawa Senyawa Pembanding Asam asetil salisilat dan Senyawa Uji Asam 2-(4-Klorobenzoiloksi)-5-metoksi Benzoat.....	61
---	----



DAFTAR GAMBAR

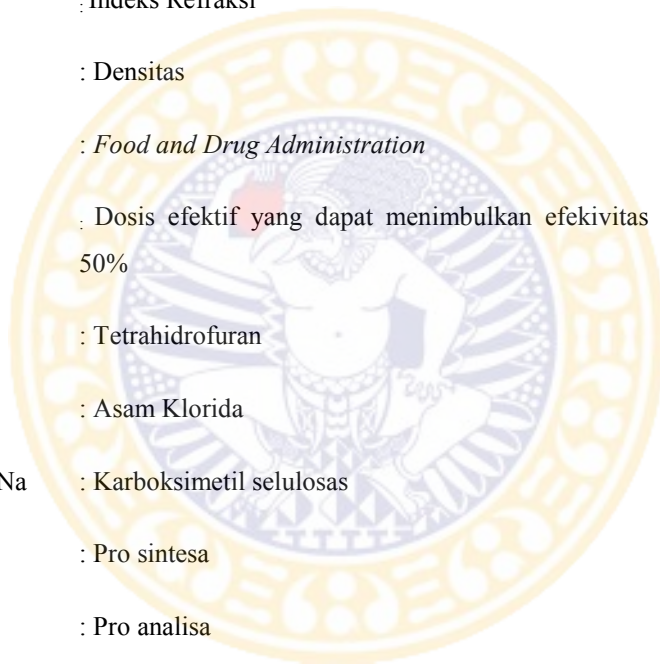
	Halaman
Gambar 2.1 Mekanisme Reaksi Substitusi Nukleofilik	13
Gambar 2.2 Struktur Senyawa asam 5-metoksi salisilat.....	13
Gambar 2.3 Struktur Senyawa 4-klorobenzoil klorida	14
Gambar 2.4 Struktur Senyawa tetrahidrofuran	14
Gambar 2.5 Struktur Senyawa piridin	16
Gambar 2.6 Mekanisme Reaksi Sintesis Senyawa Asam 2-(4-Klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat.....	17
Gambar 3.1. Skema Kerangka Konseptual	27
Gambar 4.1. Kerangka Operasional Sintesis	32
Gambar 4.2. Reaksi Sintesis Senyawa Asam 2-(4Klorobenzoiloksi)-5-metoksi Benzoat.....	34
Gambar 4.3. Bagan Uji Aktivitas Analgesik.....	46
Gambar 5.1. Spektrum Ultraviolet senyawa Asam 5-metoksi salisilat.....	50
Gambar 5.2. Spektrum Ultraviolet Asam 2-(4-Klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat	50
Gambar 5.3. Spektrum Inframerah Asam 5-metoksi Salisilat dengan Plat KBr.....	52

Gambar 5.4. Spektrum Inframerah Asam 2-(4-Klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat dalam Plat KBr	52
Gambar 5.5. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ Senyawa Asam 5-metoksi Salisilat dalam Pelarut Aseton-D6	55
Gambar 5.6. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ Senyawa Asam 2-(4-Klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat dalam Pelarut Aseton-D6	56
Gambar 5.7. Grafik Hubungan antara log Dosis dan Persen Hambat Nyeri Senyawa pembanding yaitu asam asetil salisilat.....	60
Gambar 5.8. Grafik Hubungan antara log Dosis dan % Hambat Nyeri Senyawa Uji yaitu Asam 2-(4-Klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat	61
Gambar 6.1. Struktur Senyawa Hasil sintesis yaitu Asam 2-(4-Klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat.....	67

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Perhitungan Presentase Hasil Sintesis	75
Lampiran 2	Gambar Hewan Coba Saat Uji Aktivitas Analgesik.....	76
Lampiran 3	Perhitungan Persen Hambat Nyeri	78
Lampiran 4	Tabel Statistika.....	80
Lampiran 5	Hasil Perhitungan ANOVA dan LSD Kelompok Dosis Senyawa Asam 2-(4-Klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat dengan Kelompok Dosis Pembanding Asetosal dan Kelompok Kontrol CMC-Na 0.5%.....	81
Lampiran 6	Perhitungan Regresi	86
Lampiran 7	Pakan Hewan Coba	90
Lampiran 8	Prediksi $^1\text{H-NMR}$ Senyawa Awal dan hasil sintesis	91
Lampiran 9	Sertifikat Kode Etik Penelitian.....	95

DAFTAR SINGKATAN



TL	: Titik Lebur
TD	: Titik Didih
n_D	: Indeks Refraksi
d	: Densitas
FDA	: <i>Food and Drug Administration</i>
ED ₅₀	: Dosis efektif yang dapat menimbulkan efektivitas sebesar 50%
THF	: Tetrahidrofuran
HCl	: Asam Klorida
CMC-Na	: Karboksimetil selulosas
p.s	: Pro sintesa
p.a.	: Pro analisa
ph.g	: <i>Pharmaceutical Grande</i>
BB	: Berat Badan

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Modifikasi struktur molekul merupakan metode yang digunakan dengan tujuan mendapatkan obat baru yang memiliki aktivitas lebih tinggi, menurunkan efek samping atau toksisitas, meningkatkan selektifitas obat, memperpanjang masa kerja obat, meningkatkan kenyamanan penggunaan obat, dan meningkatkan aspek ekonomis obat. Pengembangan struktur senyawa induk yang sudah diketahui aktivitas biologisnya melalui proses sintesis dan pengujian aktivitas merupakan salah satu dasar dalam proses modifikasi molekul (Siswandono dan Soekardjo, 2008).

Asam salisilat merupakan salah satu senyawa yang dikenal memiliki efek anti nyeri, anti piretik, dan anti inflamasi. Namun keracunan dan efek samping yang ditimbulkan akibat asam salisilat merupakan masalah yang menonjol di negara-negara berkembang yang menggunakannya sebagai antipiretik (Fadeyi, *et al.*, 2004). Karena itulah dilakukan modifikasi molekul dari asam salisilat dengan membentuk turunannya dengan tujuan meningkatkan aktivitas serta menurunkan insiden toksisitas dan efek samping akibat penggunaan asam salisilat.

Salah satu turunan asam salisilat yang terkenal dan digunakan di seluruh dunia adalah asam asetil salisilat (Ekinci, *et al.*, 2011). Asam asetil salisilat (Asetosal, Aspirin, Aspro[®], Rhonal[®]) merupakan senyawa analgetika non narkotika atau *Non Steroidal Anti*

Inflammatory Drugs (NSAIDs) yang mempunyai efek analgesik-antipiretik dan antirematik. Analgetika sendiri merupakan senyawa yang dapat menekan fungsi sistem saraf pusat secara selektif, digunakan untuk mengurangi rasa sakit tanpa mempengaruhi kesadaran. Analgetika bekerja dengan meningkatkan nilai ambang persepsi rasa sakit dan berdasarkan mekanisme kerja pada tingkat molekul, analgetika dibagi menjadi dua golongan yaitu analgetika narkotik dan analgetika non narkotik (Siswandono dan Soekardjo, 2008).

Asam asetil salisilat serta golongan NSAID yang lain memiliki kelompok yang berbeda-beda secara kimia tapi semuanya mempunyai kemampuan menghambat sikloogenase (COX) dan inhibisi sintesis prostaglandin yang sangat berperan untuk efek terapeutiknya. Namun inhibisi sintesis prostaglandin dalam mukosa gaster sering menyebabkan kerusakan gartointestinal yang ditandai dengan gejala klinis dispepsia, mual, dan gastritis (Davey, 2002). Penggunaan asam asetil salisilat dalam dosis rendah dan dalam waktu yang lama dapat digunakan untuk mencegah serangan jantung dan pengobatan trombosis karena mempunyai efek antiplatelet (Siswandono dan Soekardjo, 2008). Asam asetil salisilat merupakan obat asam lemah. pH asam lambung menjaga fraksi besar aspirin tidak terionisasi sehingga menunjang absorpsi dalam lambung. Namun asam asetil salisilat yang diabsorpsi dapat mengalami hidrolisis oleh esterase dalam darah dan jaringan menjadi salisilat dan asam asetat. Karena dikenal memiliki efek antirematik, asam asetil salisilat juga banyak digunakan pada terapi penyakit inflamasi sendi. Namun lebih dari 50% pasien tidak dapat mentoleransi efek sampingnya (mual, muntah, nyeri epigastrium, tinitus) akibat dosis

tinggi asam asetil salisilat larut yang diperlukan untuk mencapai efek antiinflamasi (Davey, 2002).

Meski dirasa tidak aman akibat efek samping yang ditimbulkan, (Pottega, 2014) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa 68% dari 117 pasien yang menjadi responden percaya bahwa penggunaan asam asetil salisilat lebih efektif dibanding dengan obat analgesik lain, dan 17% responden merasa bahwa onset waktu nyeri yang dirasakan lebih pendek setelah menggunakan asam asetil salisilat dibanding obat analgesik lain. Sebuah penelitian lain dengan 1964 responden di Catalonia Spanyol juga menyebutkan bahwa 27,6% responden yang mengalami nyeri melakukan *self medication* dan 44,5% responden yang melakukan *self medication* memilih menggunakan Aspirin sebagai terapi untuk melawan nyeri yang diderita. Jumlah ini paling tinggi dibandingkan dengan penggunaan Parasetamol yang hanya digunakan sekitar 35,1% dan obat analgesik lain sebesar 17,3% (Bassols, 2002).

Penggunaan asam asetil salisilat dan obat-obat NSAID lainnya dilatarbelakangi oleh perasaan nyeri yang dialami individu. Nyeri merupakan perasaan sensoris dan emosional yang tidak nyaman dan berkaitan dengan (ancaman) kerusakan jaringan. Keadaan psikis sangat mempengaruhi nyeri, misalnya emosi dapat menimbulkan sakit (kepala) dan memperhebat nyeri itu sendiri, tetapi dapat pula menghindarkan sensasi rangsangan nyeri. Nyeri merupakan suatu isyarat bahaya tentang adanya gangguan di jaringan, seperti peradangan (rematik, encok), infeksi jasad renik atau kejang otot dan memicu pelepasan zat-zat tertentu yang disebut mediator nyeri yang antara lain histamin, bradikinin, leukotrien dan prostaglandin. Setiap orang memiliki ambang toleransi nyeri yang

berbeda-beda karena nyeri adalah suatu perasaan subjektif (Tjay dan Rahardja, 2002). Data yang dihimpun *National Hospital Ambulatory Medical Care Survey* selama 10 tahun yaitu antara tahun 2000-2010 menunjukkan bahwa sekitar 45,4% pasien atau sekitar 440 juta dari 970 juta pasien datang ke departemen gawat darurat di United States dengan gejala primer atau diagnosa nyeri. Jumlah tersebut mengalami kenaikan dimana pada tahun 2000 jumlah pasien nyeri yang datang ke departemen gawat darurat adalah 35 juta pasien dan menjadi 48,2 juta pasien nyeri datang ke departemen gawat darurat pada 2010 (Yen-Chang, *et al.*, 2014).

Jumlah pasien nyeri yang relatif mengalami peningkatan tiap tahunnya mendorong peneliti untuk menemukan obat baru golongan analgetika turunan asam salisilat yang mempunyai aktifitas analgesik lebih tinggi dan efek samping lebih rendah yang dalam hal ini dilakukan penelitian dengan memodifikasi stuktur asam salisilat dengan mensintesis turunannya yaitu asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat.

Modifikasi struktur yang dilakukan pada penelitian adalah dengan mereaksikan turunan asam salisilat yaitu asam 5-metoksi salisilat dengan 4-klorobenzoil klorida sehingga membentuk senyawa turunan baru yakni asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat dan hasil samping yaitu HCl. Reaksi yang terjadi antara asam 5-metoksi salisilat dengan 4-klorobenzoil klorida ini merupakan reaksi esterifikasi yang terdiri dari dua tahap penting yaitu: (1) Substitusi nukleofil pada gugus karbonil, dan (2) Eliminasi ion klorida.

Logaritma koefisien partisi (log P) merupakan salah satu parameter lipofilik yang sering digunakan dalam Hubungan

Kuantitatif Struktur Aktivitas (HKSA) (Siswandono dan Soekardjo, 2008). Pada perhitungan sifat fisika kimia menggunakan *Chembiodraw Ultra 11.0*, asam salisilat memiliki nilai $\log P = 2,27$ dan $MR = 33,9 \text{ cm}^3/\text{mol}$ sedang asetosal mempunyai nilai $\log P = 1,21$ dan $MR = 43,29 \text{ cm}^3/\text{mol}$. Nilai $\log P$ untuk asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat = 3,51 dan $MR = 75,27 \text{ cm}^3/\text{mol}$. Peningkatan $\log P$ pada senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat diharap dapat meningkatkan penembusan senyawa ke dalam membran biologis sehingga jumlah senyawa yang berinteraksi dengan reseptor akan meningkat dan terjadi peningkatan aktivitas biologisnya.

Senyawa hasil sintesis diuji kemurniannya menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan uji penentuan titik lebur. Seperti yang telah dilakukan (Schenone, *et al.* 2005) yang mensintesis turunan baru 1,3,4-tiadiazol kemudian melakukan pengukuran titik lebur dengan menggunakan Buchi *apparatus* serta seluruh senyawa turunan tersebut dites kemurniannya menggunakan KLT (Merk, silica gel F₂₅₄ dan menggunakan metanol sebagai eluen).

(Rajitha, *et al.*, 2014) melakukan sintesis senyawa turunan N-(a-acetamido cinnamoil) aril hidrazon kemudian mengidentifikasi senyawanya menggunakan pelet KBr pada spektrofotometer Perkin-Elmer 1760 ($\text{tmax}/\text{cm}^{-1}$) sehingga didapatkan spektra IR. Dan untuk mendapatkan spektra ^1H NMR digunakan pengukuran menggunakan spektrometer GE Omega 400 MHz atau spektrometer Bruker-Avance 300 MHz. Sebagai standar internal digunakan Tetramethylsilane (TMS). Pada proses identifikasi struktur senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat dilakukan dengan

spektrofotometer UV-VIS, Spektrofotometer Inframerah (IR), dan Spektrometer Resonansi magnet inti ($^1\text{H-NMR}$) (Silverstein, 2005).

Tantangan untuk menemukan dan mengembangkan obat analgesik baru adalah dengan memfokuskan pada cara untuk mengevaluasi efektifitas. Kesempatan ini dapat dilakukan melalui hewan coba dan uji klinik pada manusia (Cannon, 2007). Untuk mengetahui efek analgesik dari suatu bahan aktif, dapat digunakan beberapa metode antara lain metode stimulasi panas dengan pemanasan *hot plate*, *tail immersion test*, stimulasi listrik pada ekor dan stimulasi kimiawi (*writhing test*) yang dilakukan pada mencit atau tikus dengan diberi senyawa penginduksi nyeri (Vogel, 2008). Untuk penelitian ini dilakukan dengan menggunakan uji *writhing test* dan hewan coba mencit (*Mus musculus*).

Metode *writhing test* dilakukan untuk menguji kemampuan obat analgesik baru dalam mencegah terjadinya geliatan dari injeksi intraperitoneal pada mencit dengan suatu bahan pengiritasi seperti asam asetat atau larutan fenilquinon (Vogel, 2008). Sebagai hewan coba digunakan mencit (*Mus musculus*) karena mudah diperoleh, relatif murah dalam pemeliharaan dan juga sering digunakan dalam uji analgesik. Metode *writhing test* telah dilakukan pula pada penelitian (Nayak, *et al.*, 2014) yang meneliti aktivitas analgesik, anti-inflamasi serta antibakteri satu seri turunan senyawa amida hetosiklik baru. *Writhing test* ini dilakukan pada mencit yang diinduksi dengan asam asetat. Dari hasil uji ini, hanya 2 senyawa dari 1 seri turunan yang memiliki indikasi aktivitas baik dalam menurunkan nyeri yaitu 2-florofenil pirazin asetamide dan 2-bromofenil pirazin asetamida setelah dibandingkan dengan asam asetil salisilat.

Dari hasil penelitian ini diharapkan diperoleh senyawa baru asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat dengan aktifitas analgesik yang lebih tinggi dibanding aspirin. Hasil penelitian diharap dapat memberi sumbangan kepada dunia kesehatan melalui usaha pengembangan obat baru golongan analgesik non narkotik atau NSAID yang poten dan memiliki efek samping atau toksisitas yang rendah.

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian diatas, rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

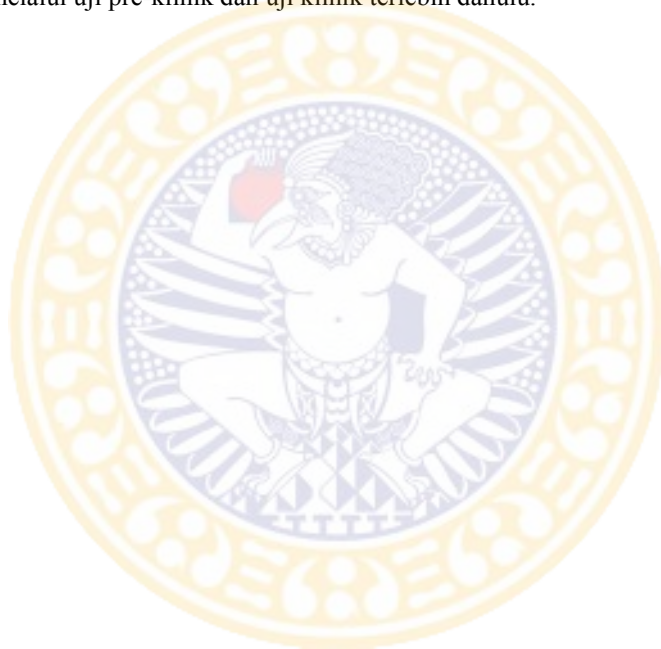
1. Apakah reaksi esterifikasi antara asam 5-metoksi salisilat dengan 4-klorobenzoil klorida dapat berlangsung dan menghasilkan senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat
2. Apakah senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat mempunyai aktivitas analgesik yang lebih besar dibanding asam asetil salisilat dengan menggunakan metode *writhing test* pada mencit (*Mus musculus*)?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mendapatkan senyawa baru turunan asam salisilat yaitu asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat dari hasil reaksi esterifikasi antara asam 5-metoksi salisilat dengan 4-klorobenzoil klorida.
2. Membandingkan aktivitas analgesik antara senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat dengan asam asetil salisilat melalui metode *writhing test* pada mencit (*Mus musculus*).

1.4 Manfaat Penelitian

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat dihasilkan suatu senyawa hasil esterifikasi yaitu asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat dari reaksi antara asam 5-metoksi salisilat dengan 4-klorobenzoil klorida yang diharapkan memiliki aktivitas lebih besar daripada asam asetil salisilat (asetosal). Sehingga dapat digunakan sebagai calon alternatif obat analgesik baru yang tentunya telah melalui uji pre-klinik dan uji klinik terlebih dahulu.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Sintesis

Sintesis merupakan rangkaian proses kimia yang melibatkan proses pemutusan ikatan kimia lama dan membentuk ikatan kimia baru. Dalam sintesis suatu senyawa, besar gugus dan sifat gugus yang meliputi efek halangan ruang serta elektronegativitas berpengaruh dalam spontanitas reaksi. Selain itu, kadar dan sifat reaktan, suhu, tekanan, pengadukan, serta adanya katalisator juga turut memberikan andil dalam reaksi sintesis (Fessenden, 1998).

2.2 Analgetika

Analgetika merupakan senyawa yang secara selektif dapat menekan fungsi sistem saraf pusat tanpa mempengaruhi kesadaran dalam usaha untuk mengurangi rasa sakit atau nyeri. Peningkatan terhadap nilai ambang persepsi rasa sakit adalah cara obat analgetika bekerja.

Berdasarkan mekanisme kerja pada tingkat molekul, analgetika dibagi menjadi dua golongan yaitu analgetika narkotika dan analgetika non narkotika. Efek analgesik yang dihasilkan dari golongan analgetika narkotik merupakan akibat dari adanya ikatan antara obat dengan sisi reseptor khas yang berada dalam otak dan *spinal cord* sehingga dapat menimbulkan efek euforia dan rasa kantuk. Sedangkan golongan analgetika

non narkotika bekerja pada perifer dan sentral sistem saraf pusat dimana penggunaan obat golongan analgetika non narkotik lebih ditujukan untuk mengurangi rasa sakit yang ringan hingga moderat. Penghambatan secara langsung dan selektif terhadap enzim-enzim pengkatalisis biosintesis prostaglandin seperti sikloogenase merupakan aksi langsung obat analgetika non narkotika dalam menimbulkan efek analgesik (Siswandono dan Soekardjo, 2008).

Obat analgetika juga memiliki efek antipiretika seperti senyawa golongan salisilat, anilin, analog aminofenol, turunan quinolon dan pirazolon (Kar, 2006).

2.3 Asam asetil salisilat (Asetosal)

Asetosal merupakan obat yang paling banyak digunakan di seluruh dunia. Asetosal disintesis pertama kali di Jerman tahun 1887 yang didasari pada penemuan efek anti-inflamasi pada asam salisilat yang diekstrak dari kulit pohon willow (*Salix alba*) tahun 1828. Asetosal dapat menimbulkan beberapa efek dalam tubuh terutama efek anti inflamasi, analgesik, pencegahan dalam proses pembekuan darah hingga penurunan panas. Efek ini didapat akibat proses penurunan produksi prostaglandin dan tromboxan (Ekinci, *et al.*, 2011).

Kemampuan asetosal dalam penurunan produksi prostaglandin dan tromboxan merupakan akibat inaktivasi secara irreversibel enzim sikloogenase (COX) dimana enzim sikloogenase (COX) berperan dalam sintesis prostaglandin dan tromboxan sehingga dengan dosis 81-325 mg sekali dalam sehari dapat digunakan sebagai efek anti platelet (Katzung, 2014).

Asetosal berperan sebagai agen asetilasi dimana gugus asetil akan berikatan dengan residu serin pada sisi aktif dari enzim sikloogenase (COX)

Penghambatan prostaglandin oleh asetosal dapat menimbulkan efek yang buruk pada mukosa gastrointestinal, aliran darah ginjal, dan hemostasis tubuh berakibat pada terbatasnya penggunaan klinis asetosal saat ini (AHFS, 2008).

2.4 Tinjauan tentang Nyeri

Definisi nyeri menurut International Association of Pain (IASP,1979) adalah pengalaman emosi dan sensori yang tidak menyenangkan dimana berhubungan dengan kerusakan jaringan atau potensial terjadi kerusakan jaringan. Nyeri merupakan suatu perasaan subjektif pribadi dan ambang toleransi nyeri berbeda-beda bagi setiap orang (Tjay dan Rahardja, 2007).

Nyeri umumnya awal dari respon menarik dan menghindar oleh tubuh. Nyeri memberikan peringatan bahwa ada sesuatu yang salah sehingga mempengaruhi reaksi tubuh dengan memberikan perasaan yang tidak menyenangkan. Nyeri adalah hasil stimulai dari reseptor nyeri pada perifer (nosiseptor) yang mengirimkan impuls rasa sakit ke otak. Nosiseptor ini diaktivasi oleh rangsangan mekanis, panas, dan kimiawi (Burret *et al.*,2010)

Menurut perkiraan, zat-zat mediator tersebut meningkatkan kepekaan ujung saraf sensoris bagi rangsangan nyeri yang diakibatkan oleh mediator lainnya. Selain itu zat-zat ini berkhasiat vasodilatasi kuat dan meningkatkan permeabilitas

kapiler yang mengakibatkan radang dan udem (Tjay dan Rahardja, 2007).

2.5 Tinjauan Tentang Reaksi Esterifikasi

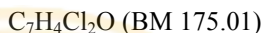
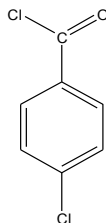
Suatu senyawa asam karboksilat yang direaksikan dengan alkohol dapat diubah secara langsung menjadi ester dengan proses pemanasan dan penggunaan katalis seperti senyawa asam pekat atau basa. Reaksi ini merupakan reaksi esterifikasi atau reaksi pembentukan suatu ester. Sintesis ester juga dapat dilakukan dari reaksi antara asil klorida dengan alkohol dengan bantuan katalis piridin. Reaksi ini lah yang selanjutnya disebut reaksi asilasi. Penambahan piridin ditujukan untuk menetralkan HCl yang merupakan hasil samping dari reaksi (Solomons, 2014).

Ketika kuantitas kedua reaktan adalah sama dalam reaksi, maka pada kesetimbangan dapat terjadi reaksi yang bersifat reversibel. Reversibilitas inilah yang merupakan kelemahan dalam reaksi ini. Namun, dengan penggunaan jumlah salah satu reaktan yang diletakkan, masalah reversibilitas ini dapat diminimalkan (Solomons, 2014).

Reaksi esterifikasi secara langsung memberikan keuntungan karena hanya dengan dilakukan satu tahap sintesis sudah didapatkan suatu produk ester (Morrison, 1992).

Mekanisme reaksi pembentukan ester adalah substitusi nukleofilik pada atom karbonil yang bersifat kekurangan elektron. Sehingga dengan bantuan katalisator membuat atom karbon lebih rentan terhadap serangan nukleofil (McMurry, 2015)

2.6.2 4-Klorobenzoil Klorida



Gambar 2.3 Struktur 4-klorobenzoil klorida

Merupakan cairan tidak berwarna dan tidak berbau dengan titik lebur TL 12-14 °C dan densitas senilai 1.370. 4-klorobenzoil klorida dapat menyebabkan rasa terbakar pada kulit dan kerusakan mata (Fisher Scientific, 2015). Pada penelitian ini digunakan sebagai reaktan.

2.6.3 Tetrahirofuran



Gambar 2.4 Struktur Tetrahidrofuran

Merupakan cairan tidak berwarna yang berbau seperti eter. THF memiliki titik didih -108.5°C, dengan n_D^{20} 1.407. Larut dalam air, alkohol, keton, ester, eter, dan hidrokarbon. THF memiliki bahaya potensial bila terpapar dalam jumlah yang berlebihan adalah iritasi mata, dan kerusakan sistem saraf atas,

mual, pusing, dan sakit kepala (Budavari S. *et al.*, 2006). Dalam penelitian ini digunakan sebagai pelarut.

2.6.4 FeCl_3 (Ferri Chlorida)

BM= 295.60

Merupakan zat dengan bentuk molekul heksagonal berupa lembaran atau serpihan gelap, berwarna merah karena mentransmisikan cahaya, hijau karena merefleksikan cahaya, kadang-kadang kelihatan coklat kehitaman, sangat higroskopis. Larut dalam air, alkohol, eter, aseton, mudah larut dalam CS_2 . Praktik tidak larut dalam etil asetat. Ferri klorida dapat menyebabkan iritasi jika dalam bentuk anhidrat (Budavari S. *et al.*, 2006). Dalam penelitian ini untuk mengetahui sepenuhnya reaksi dengan mendeteksi adanya asam salisilat.

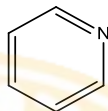
2.6.5 Metanol

CH_4OH (BM= 32,04)

Merupakan cairan jernih, tidak berwarna, mudah mengalir, mudah terbakar, bau enak, rasa terbakar. Memiliki *Vapor density*: 1.11 (udara=1). Metanol larut air, etanol, eter, benzena, keton, dan beberapa solven organik lainnya. Bila terpapar secara berlebihan dapat menyebabkan iritasi mata, kulit, saluran pernafasan atas, dermatitis, pusing, vertigo, mual, muntah, berkurangnya nafsu makan,

kelemahan, gangguan penglihatan mata, dilatasi pupil, dan kebutaan bilateral (Budavari S. *et al.*, 2006). Dalam penelitian ini digunakan sebagai pelarut rekristalisasi.

2.6.6 Piridin



C_5H_5N ; (BM = 79,10)

Gambar 2.5 Struktur piridin

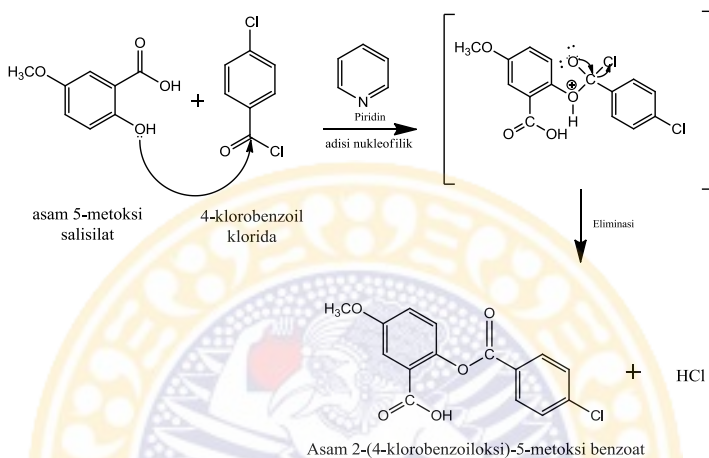
Merupakan cairan berwarna dengan bau menusuk dengan titik didih $115,2^{\circ}$ - $115,3^{\circ}C$. Larut dalam air, alcohol, eter, petroleum eter, minyak dan beberapa cairan organik. Bila terpapar berlebihan dapat menyebabkan pusing, insomnia, mual, muntah, tidak nafsu makan.

2.7 Tinjauan Tentang Sintesis Senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat

Prinsip mekanisme reaksi untuk senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat adalah reaksi asilasi yang menggunakan metode Schoutten Baumann modifikasi dimana digunakan basa lemah seperti piridin sebagai katalisator serta pelarut THF (Solomons, 2014)

Pada reaksi pembentukan asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat didasari pada reaksi substitusi nukleofilik (McMurry, 2015) dimana yang berperan sebagai gugus

nukleofilik adalah asam 5-metoksi salisilat. Gugus nukleofilik akan menyerang gugus karbonil pada 4-klorobenzoil klorida yang merupakan pusat penyerangan utama.



Gambar 2.6 Mekanisme reaksi sintesis senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat

2.8 Tinjauan Tahap Penentuan Senyawa Hasil Sintesis

2.8.1 Tinjauan Tentang Penentuan Jarak Lebur

Titik lebur dari suatu padatan merupakan suatu sifat fisika yang dapat digunakan sebagai metode untuk identifikasi. Titik lebur merupakan suhu dimana suatu senyawa berada dalam kecsetimbangan antara fase solid dan likuid. Titik lebur suatu padatan biasanya berada dalam jarak lebur dimana suhu dihitung saat pertama padatan berubah menjadi bentuk likuid dan berakhir sampai seluruh sampel berubah menjadi bentuk likuid.

Penentuan jarak lebur memberikan indikasi kasar mengenai kemurnian dari suatu senyawa. Semakin murni suatu senyawa, semakin tinggi harga titik lebur dan semakin sempit jarak lebur (Schoffstall, *et al.*, 2000).

2.8.2 Tinjauan Tentang Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis merupakan salah satu teknik yang cukup banyak digunakan untuk memisahkan dan mengidentifikasi suatu senyawa. Teknik ini dilakukan karena simpel, murah dan selektif (Wilson, 1999).

Data faktor retensi (R_f) dapat digunakan sebagai proses identifikasi terhadap suatu senyawa dengan membandingkan dengan harga R_f standar pada kondisi kromatografi yang sama. Namun proses ini tidaklah mudah mengingat suatu senyawa bersifat

sangat kompleks dan tidak jarang memiliki kesamaan struktur.

Untuk meningkatkan kemungkinan identifikasi dengan KLT, dilakukan pengembangan menggunakan perbedaan 3 sistem eluen. Dalam praktiknya faktor selektivitas total dan kekuatan total dari eluen harus berbeda (Grushka *and* Grinberg., 2009).

2.8.3 Tinjauan Tentang Spektrofotometri Ultraviolet-Visible (UV-VIS)

Spektrofotometri UV merupakan salah satu metode yang digunakan dalam penentuan struktur molekul organik karena informasi yang diberikan adalah mengenai adanya struktur terkonjugasi dalam senyawa (McMurry, 2015). Sumber radiasi elektromagnetik UV dekat adalah pada 200 nm-300 nm dan untuk sinar tampak adalah 380 nm -780 nm. Pada radiasi UV dengan panjang gelombang yang sesuai, terjadi penyerapan energi yang mengakibatkan elektron dari gugus-gugus atom dalam suatu senyawa akan tereksitasi dari keadaan dasar ke tingkat yang lebih tinggi, Gugus-gugus yang dapat menyerap radiasi pada sinar UV dan sinar tampak inilah yang disebut gugus kromofor. Penyerapan energi yang terjadi kemudian terdeteksi dan ditampilkan pada grafik plot panjang gelombang vs absorbansi (Pavia, 2009).

2.8.4 Tinjauan Tentang Spektrofotometri Infra Merah (IR)

Spektrofotometer Infra Merah (IR) digunakan untuk identifikasi gugus fungsi dalam suatu molekul organik (Silverstein, 2005).

Penggunaan spektra IR didasarkan pada perbedaan molekul dalam menyerap radiasi infra merah yang diinterpretasikan dalam kenaikan amplitudo getaran pada atom-atom yang terikat atau dalam keadaan vibrasi tereksitasi sehingga spektra IR suatu senyawa membentuk sidik jari yang unik pada daerah sidik jari yaitu pada 1500 cm^{-1} sampai 400 cm^{-1} . Dengan mempelajari absorpsi yang terjadi pada gugus fungsi tertentu, maka ada kemungkinan didapat informasi mengenai struktur senyawa dari spektra IR (McMurry, 2015).

2.8.5 Tinjauan Tentang Spektrometri Resonansi Magnet Inti (^1H -NMR)

Spektroskopi NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) merupakan metode penentuan struktur yang paling bernilai dalam kimia organik. Hal ini dikarenakan dengan metode ini dapat dilakukan *mapping* terhadap kerangka molekul hidrogen dari suatu senyawa (McMurry, 2015). Hal ini didasarkan pada prinsip bahwa inti dari suatu unsur akan berputar pada sumbunya. Ketika senyawa dengan proton ditempatkan dalam medan magnet yang sangat kuat dan

secara bersamaan diberikan radiasi elektromagnetik pada frekuensi yang sesuai, maka inti dari senyawa tersebut akan menyerap energi melalui proses yang disebut resonansi magnetik (Solomons, 2014).

2.9 Metode Pengujian Aktifitas Analgesik

Tantangan dalam penemuan dan pengembangan obat analgetika baru terpusat pada evaluasi terkait pada pengujian efektivitas yang dilakukan. Tantangan akan efektifitas obat baru ini dibuktikan melalui pengujian terhadap hewan coba sebelum diberikan pada manusia (Cannon, 2008).

Penggunaan hewan pengerat seperti tikus atau mencit dibutuhkan untuk uji analgesik, namun untuk beberapa hal diperlukan hewan yang lebih tinggi tingkatnya seperti monyet untuk uji analgesik. Metode pengujian aktifitas analgesik secara *in vivo* diklasifikasikan sesuai sasaran kerja dari analgesik yaitu aktifitas analgesik sentral dan aktivitas analgesik perifer (Vogel, 2008).

2.9.1 Metode Pengujian Aktivitas Analgesik Sentral

2.9.1.1 Metode HAFFNER's Tail Clip

Pada metode ini, arteri klip digunakan pada pangkal ekor (sekitar 1 cm dari tubuh) sebagai induksi nyeri. Respon yang diberikan oleh mencit adalah mengginggit klip atau ekor yang berada disekitar klip. Waktu antara stimulasi dan respon ditentukan dengan stopwatch pada sepersepuluh deti setelah kenaikan ekor. (Vogel, 2008).

2.9.1.2 Metode *Tail Flick*

Pencukuran serta pembungkusan terhadap ekor dari mencit dan tikus dengan cat hitam yang mengabsorpsi panas adalah perlakuan untuk metode ini. Mencit atau tikus ditempatkan dalam balok dengan lampu infrared panas agar ekor mendapatkan panas maksimal. Waktu dicatat setelah mencit atau tikus mengibaskan ekor untuk pertama kali setelah ekor diberikan induksi panas (Cannon, 2007).

2.9.1.3 Metode *Hot Plate*

Metode ini dilakukan dengan meletakkan mencit atau tikus ke dalam hot plate yang telah ditentukan suhunya. Waktu dihitung mulai dari mencit dimasukkan dalam *hot plate* sampai hewan coba memberikan respon berupa meloncat, menarik telapak kaki, dan menjilat telapak kaki (Cannon, 2007).

2.9.1.4 Metode *Tail Immersion Test*

Prosedur pengujian ini didasarkan pada obat-obat mirip morfin selektif yang mampu memperpanjang waktu reaksi dari reflek menarik ekor pada tikus atau mencit yang bagian ujung ekornya dicelupkan pada air hangat sekitar suhu 55°C (Vogel, 2008)

2.9.1.5 Metode Stimulasi Listrik

Setelah diketahui bahwa ekor mencit atau tikus mempunyai sensitivitas yang tinggi terhadap stimulus, dikembangkan pula stimulus yang berasal dari variasi terhadap durasi aliran listrik atau peningkatan daya listrik. Mencit ditempatkan pada kandang dan pada ekor diberikan klip serta elektroda positif kemudian aliran listrik dialirkan pada intensitas daya yang konstan yaitu antara 40-50 Volt dengan waktu respon normal sekitar 4-5 detik (Vogel, 2008)

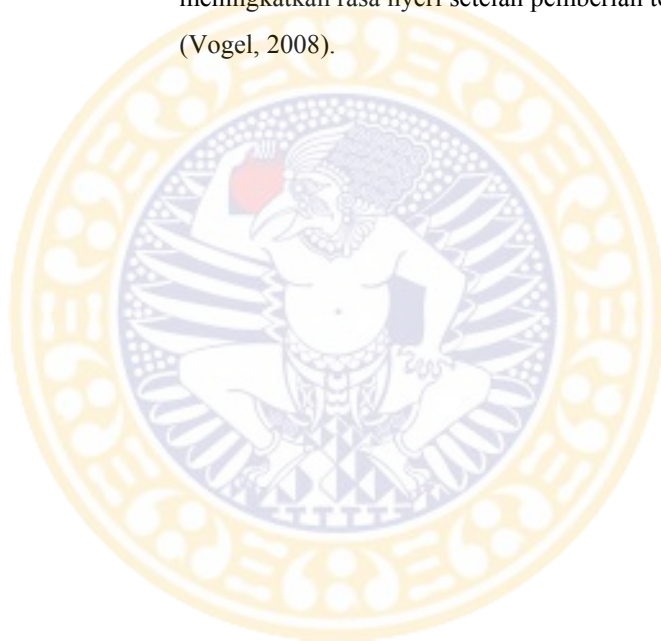
2.9.2 Metode Pengujian Aktivitas Analgesik Perifer

2.9.2.1 Metode *Writhing Test*

Induksi nyeri didapatkan dari injeksi suatu bahan pengiritasi pada rongga peritoneal dari mencit. Respon hewan uji dilihat dari karakteristik perilaku menggeliat. Zat pengiritasi dapat berupa fenilquinon atau asam asetat yang diinjeksikan secara peritoneal pada mencit. Pada metode ini, digunakan 2 kelompok mencit yang terdiri dari kelompok uji dan kelompok kontrol masing-masing 6 mencit. Tiap kelompok diamati jumlah geliatan yang dilakukan mencit selama 10 menit (Vogel, 2008)

2.9.2.2 Metode *RANDALL-SELITTO-Test in Rats*

Metode ini dilakukan untuk menentukan aktivitas analgesik berdasarkan prinsip bahwa inflamasi dapat meningkatkan sensitivitas terhadap nyeri dan sensitivitas ini rentan dengan pemberian analgesik. Dalam metode ini digunakan Brewer yeast sebagai penginduksi inflamasi yang akan meningkatkan rasa nyeri setelah pemberian tekanan (Vogel, 2008).



BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual

Dalam usaha untuk meningkatkan aktivitas suatu senyawa induk, maka dilakukan alternatif yaitu dengan memodifikasi struktur dari senyawa induk yang dalam penelitian ini akan dilakukan modifikasi struktur asam salisilat dengan menambahkan gugus metoksi pada gugus benzena dan 4-kloro benzoil klorida pada gugus hidroksi sehingga dapat dihasilkan suatu turunan asam salisilat baru yaitu senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat.

Penambahan gugus metoksi dan 4-klorobenzoil klorida pada senyawa induk asam salisilat mempengaruhi parameter hidrofobik, elektronik, serta sterik (MR). Hal ini terbukti pada perhitungan sifat fisika kimia menggunakan *Chemdraw Ultra 11.0* yang menunjukkan bahwa harga Log P yang merupakan parameter hidrofobik senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat sebesar 3,51 dan MR yang merupakan parameter sterik menjadi 75,27 cm³/mol. Harga ini lebih tinggi bila dibandingkan dengan asetosal yang juga merupakan senyawa turunan asam salisilat yang lain dimana harga Log P asetosal hanya 1,21 dan MR sebesar 43,29 cm³/mol. Dengan demikian diharapkan senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat mengalami peningkatan dalam penembusan senyawa ke dalam membran biologis sehingga jumlah senyawa

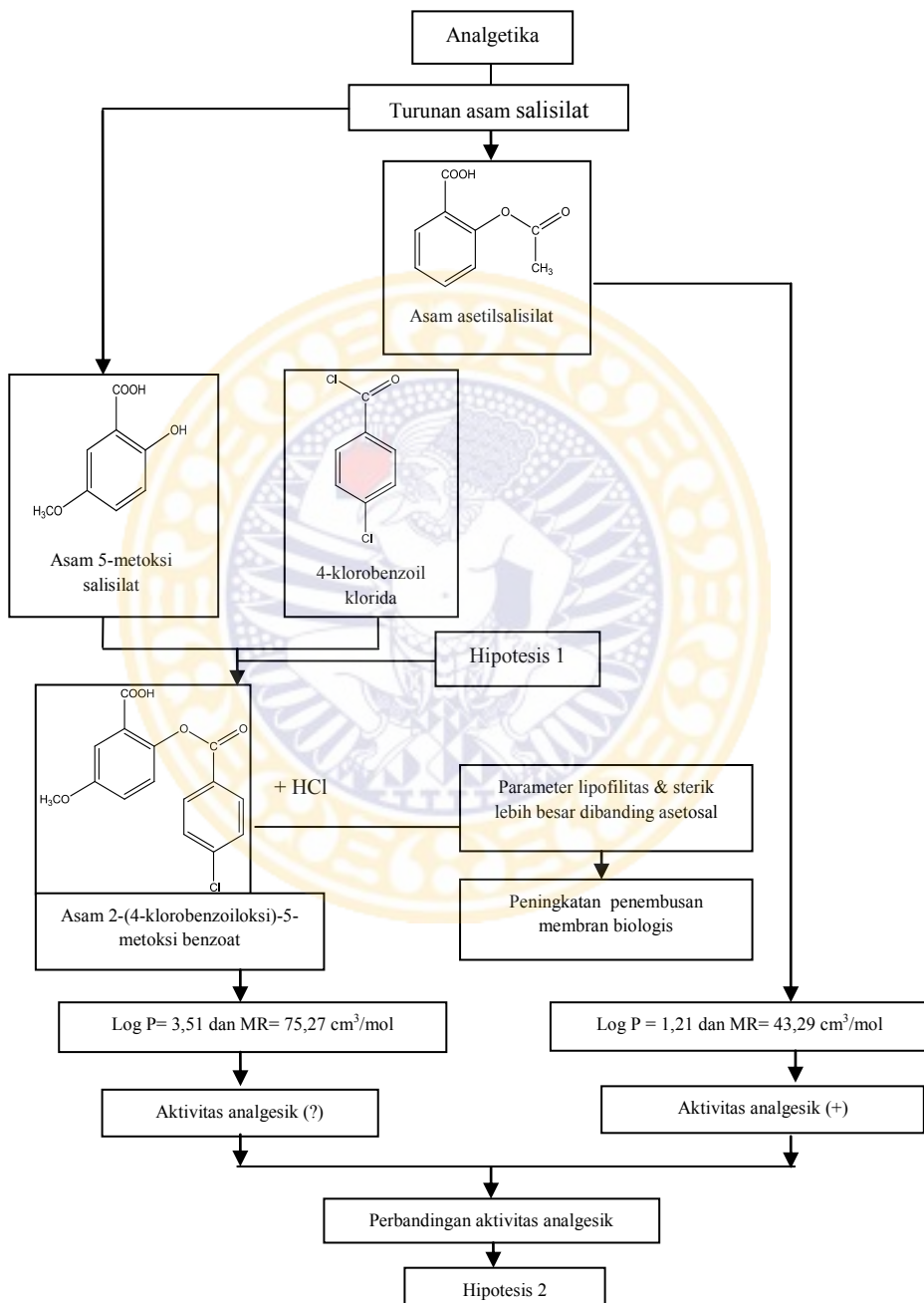
yang berinteraksi dengan reseptor akan meningkat dan terjadi pula peningkatan aktivitas biologis.

Rancangan sintesis dalam penelitian ini menganut prinsip reaksi esterifikasi dimana akan terjadi reaksi substitusi nukleofilik pada atom karbonil yang kekurangan elektron, dan dalam hal ini adalah atom karbonil pada 4-klorobenzoiloksi klorida dan gugus hidroksi dari asam salisilat yang bertindak sebagai nukleofil. Pada reaksi ini digunakan pelarut THF.

Hasil sintesis kemudian dianalisis melalui beberapa tahap untuk memastikan bahwa senyawa hasil sintesis memang benar yang diinginkan. Tahap tersebut meliputi penentuan titik lebur senyawa, penentuan dengan kromatografi lapis tipis, penentuan dengan metode spektrofotometri IR, UV-VIS, juga Resonansi Magnet Inti ($^1\text{H-NMR}$).

Untuk pengkajian aktivitas analgesik dari senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat dilakukan dengan metode *Writhing test* pada hewan coba mencit putih (*Mus musculus*) galur Blab-C. Pada uji ini ditentukan pula ED_{50} yang merupakan dosis yang ditimbulkan agar menimbulkan aktivitas sebesar 50%.

3.2 Skema Kerangka Konseptual



3.3 Hipotesis

1. Reaksi esterifikasi antara asam 5-metoksi salisilat dengan 4-klorobenzoil klorida dapat berlangsung dan menghasilkan senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat
2. Senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat mempunyai aktivitas analgesik yang lebih besar dari asam asetil salisilat bila diuji menggunakan metode *writhing test* pada mencit (*Mus musculus*).



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini dilakukan dua tahap eksperimen, yang pertama adalah sintesis senyawa uji yaitu asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat. Senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat merupakan variabel tergantung dengan variabel bebas adalah kedua reaktan yang digunakan untuk membentuk senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat yaitu asam 5-metoksi salisilat dan 4-klorobenzoil klorida yang dihubungkan dengan suatu mekanisme reaksi esterifikasi.

Eksperimen tahap kedua adalah uji aktivitas analgesik untuk membuktikan hipotesis bahwa senyawa uji hasil sintesis yaitu senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat memiliki aktivitas analgesik yang lebih besar dibanding asam asetil salisilat bila diujikan pada mencit (*Mus musculus*). Berdasarkan hipotesis tersebut dapat diidentifikasi variabel-variabel penelitiannya, dimana jenis senyawa dan dosis yang diberikan pada mencit berlaku sebagai variabel bebas dan variabel tergantungnya adalah aktivitas analgesik yang ditunjukkan dengan frekuensi geliat, % hambat nyeri, dan harga ED₅₀. Proses biokimiawi dan imunologi dalam tubuh mencit merupakan variabel penghubung. Variabel kontrol meliputi bentuk pembawa senyawa uji, pembanding, dan kontrol, serta

injeksi intraperitoneal yang dilakukan pada seluruh unit populasi, jenis penginduksi yang digunakan, dan metode yang digunakan untuk mengamati aktivitas analgesik yaitu metode *writhing test*.

Penelitian ini termasuk dalam kategori penelitian *true eksperimental* karena dalam penelitian ini dilakukan randomisasi dan replikasi pada unit populasi (hewan coba) dimana digunakan sejumlah tertentu hewan coba yaitu mencit yang diambil secara acak untuk tiap-tiap dosis senyawa uji, pembanding atau kontrol. Senyawa uji yang ingin diketahui aktivitas analgesiknya adalah senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat dan senyawa pembanding yaitu asam asetil salisilat atau asetosal dalam suspensi CMC-Na 0,5% serta suspensi CMC-Na 0,5% saja yang merupakan senyawa kontrol.

4.2 Bahan Penelitian

4.2.1 Bahan Kimia

Asam 5-metoksi salisilat p.s. (Aldrich), asetosal ph.g. (Sigma), 4-klorobenzoil klorida p.s (Sigma), HCl p.a (Aldrich), THF p.a. (E.Merck), metanol p.a. (E.Merck), Etil asetat p.a. (E.Merck), kloroform p.a. (E.Merck), n-heksana p.a (E.Merck), natrium karboksimetil selulosa ph.g. (Interbat), aseton (E.Merck), asam asetil salisilat, asam asetat glasial p.a. (E.Merck), lempeng kromatografi silica gel 60 GF254 (E.Merck), kapas steril, etanol 70% teknis (E.Merck), metanol absolut p.a (E.Merck), dan aqua pro injeksi.

4.2.2 Hewan Coba

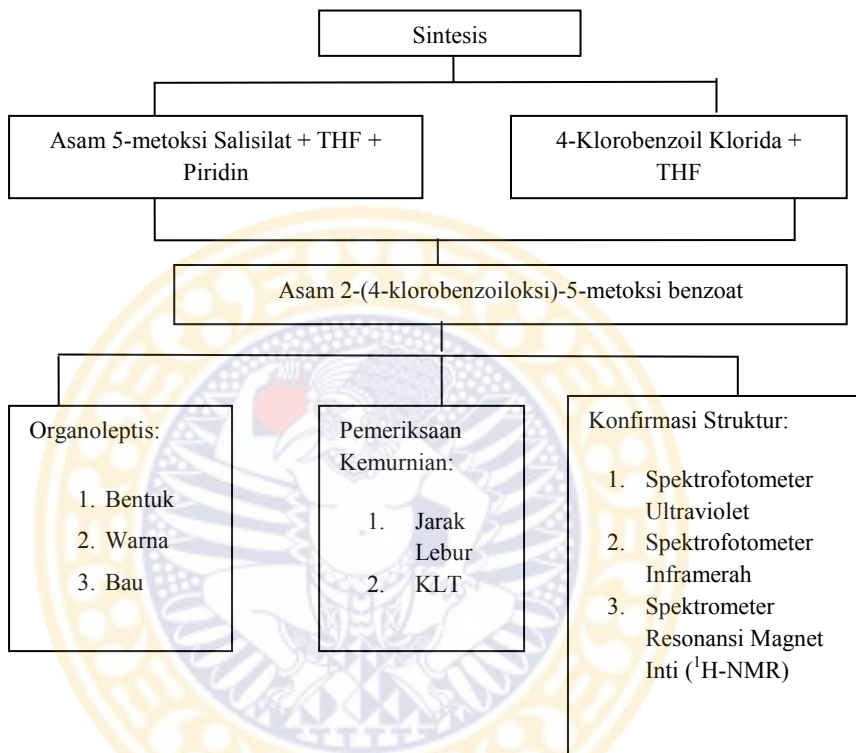
Hewan coba mencit putih (*Mus Musculus*) galur Balb “C” diperoleh dari Pusat Veteriner Farma (PUSVETMA), Jl. Ahmad Yani, Surabaya dengan karakteristik: jantan, umur 2-3 bulan, berat badan 20-30 gram, sehat dan tidak ada kelainan yang tampak pada bagian tubuh. Sebelum diberi perlakuan terhadap mencit, dilakukan adaptasi dengan lingkungan selama 1 minggu dan diberikan makanan standar serta minum, kemudian mencit dipuasakan semalaman sebelum diberi perlakuan dan untuk setiap mencit hanya digunakan satu kali saja.

4.3 Alat

Seperangkat alat sintetis, Neraca analitik (Ohaus), timbangan mencit AND HL 100, Hot *plate-magnetic stirrer* (Labinco L 32), bejana kromatografi lapis tipis (KLT), lampu UV-254 nm (Topcon), *Electrothermal Melting Point Apparatus Baush-Lomb*, *Injection disposable syringe* (Terumo), spektrofotometri UV-Vis lambda EZ 201, spektrofotometer FT-IR Jasco FT-IR-5300, resonansi magnet inti ($^1\text{H-NMR}$) Hitachi FT-NMR R-1900, Stop watch, termometer, dan seperangkat alat gelas.

4.4 Kerangka Operasional Sintesis

Kerangka Operasional sintesis dapat dilihat secara skematis seperti yang terlihat pada gambar 4.1



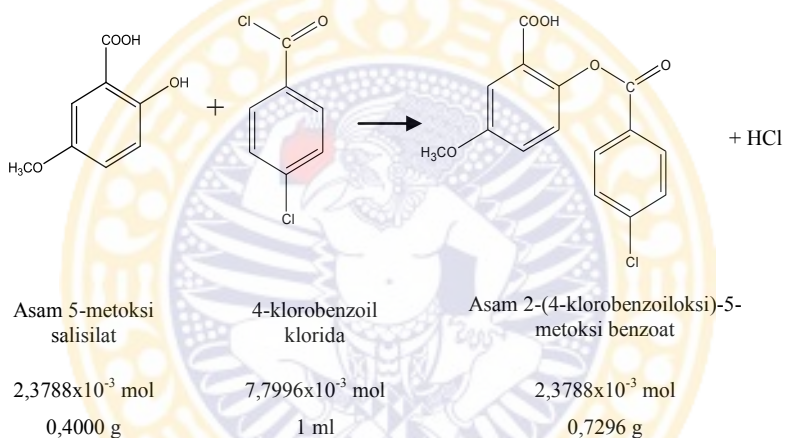
Gambar 4.1 Kerangka Operasional Sintesis

4.5 Prosedur Sintesis Asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5 metoksi benzoat

Senyawa Asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat disintesis dari asam 5-metoksi salisilat dan 4-klorobenzoil klorida dengan prosedur sebagai berikut:

$2,3788 \times 10^{-3}$ mol (0,4000 g) asam 5-metoksi salisilat dilarutkan dalam 20 ml THF dengan ditambah piridin 0,5 ml pada labu alas bulat. $7,7996 \times 10^{-3}$ mol (1,365 gram = 1 mL) 4-klorobenzoil klorida dicampur dengan 10 ml THF dalam corong pisah. Larutan 4-klorobenzoil klorida diteteskan ke dalam larutan asam 5-metoksi-salisilat dengan piridin tetes demi tetes sampai habis pada suhu $0-5^{\circ}\text{C}$. Campuran dibiarkan selama 30-60 menit pada suhu kamar. Campuran kemudian direfluks dan diaduk dengan *magnetic stirrer* diatas *hot plate* pada suhu $50-60^{\circ}\text{C}$. Campuran kemudian dicek dengan menggunakan KLT dan reagen FeCl_3 tiap jam untuk mengetahui apakah masih terdapat senyawa asam 5-metoksi-salisilat. Bila masih terdapat asam 5-metoksi salisilat maka akan timbul warna violet merah dan campuran harus dipanaskan kembali hingga warna violet merah akibat reaksi dengan FeCl_3 menjadi tidak berwarna yang menunjukkan seluruh reagen telah menjadi produk. Setelah 6 jam direflux, sisa THF diuapkan dengan menggunakan rotavapor. Produk campuran kemudian didinginkan dan dituang ke dalam beker glass yang berisi 50 ml aquadest hingga terbentuk endapan. Endapan yang didapatkan kemudian disaring dan dicuci dengan aquadest panas menggunakan corong Buchner sampai bebas HCl (dicek dengan KLT), lalu dilakukan penimbangan terhadap endapan dengan neraca. Setelah itu dilakukan rekristalisasi

dengan menggunakan metanol panas hingga tepat larut, lalu saring panas. Hasil penyaringan didinginkan dan dilakukan pendiaman pada waktu tertentu agar terbentuk kristal. Kristal yang didapatkan kemudian disaring dan dicuci dengan metanol dingin menggunakan corong Buchner kemudian dikeringkan dalam oven ad kering. Hasil pengeringan ditimbang dan dihitung persentase hasil. Penjelasan lebih lanjut dapat dilihat pada Gambar 4.2



Gambar 4.2 Reaksi sintesis senyawa Asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5 metoksi benzoat

4.6 Analisis senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat

4.6.1 Pemeriksaan Organoleptis dan reaksi warna

Pemeriksaan meliputi bentuk, warna, bau dan kelarutan.

4.6.2 Pemeriksaan Kemurnian Senyawa dengan Penentuan Titik Lebur

Dalam pemeriksaan titik lebur ini digunakan alat penentu jarak lebur *Mel-Temp Electrothermal*. Sedikit zat (senyawa hasil sintesis) digerus sampai halus kemudian dimasukkan ke dalam pipa kapiler yang salah satu ujungnya tertutup sampai setinggi ± 3 mm – 5 mm. Pipa kapiler kemudian diletakkan di dalam alat penentu titik lebur dan alat dinyalakan. Kenaikan suhu alat diamati sambil mengamati pula zat yang ada dalam pipa kapiler saat zat mulai meleleh sampai zat meleleh semua yang kemudian dicatat sebagai jarak lebur. Dalam pemeriksaan ini dilakukan replikasi sebanyak tiga kali dan setiap pengulangan dilakukan setelah menurunkan terlebih dahulu suhu alat.

4.6.3 Konfirmasi Struktur dengan Kromatografi Lapis Tipis

Analisis kromatografi lapis tipis dilakukan dengan menggunakan fase diam lempeng silika gel 60 GF-254 dan pipa kapiler 2 μ l. Sampel yang akan dianalisis dilarutkan dalam etanol kemudian ditotolkan pada lempeng kromatografi. Sebelum dilakukan analisis, terlebih dahulu dilakukan penjenjuran bejana kromatografi dengan sistem fase gerak. Selanjutnya lempeng dimasukkan ke dalam bejana kromatografi dan dilakukan eluasi dengan berbagai sistem fase gerak. Adapun fase gerak yang digunakan adalah:

Etil Asetat: Metanol = 7:3

Kloroform: Aseton = 7:3

Kloroform: Metanol = 3:2

Setelah dieluasi, lempeng dikeringkan kemudian diamati nodanya dengan lampu UV pada panjang gelombang 256 nm. Senyawa dikatakan murni apabila tidak ada noda lain atau noda yang terbentuk adalah tunggal.

4.6.4 Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer UV-VIS

Sampel dilarutkan dalam pelarut etanol absolut, kemudian diukur serapannya pada daerah UV dengan panjang gelombang 200-400 nm, kemudian diamati panjang gelombang maksimumnya.

4.6.5 Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer *Fourier-Infrared*

Sampel kurang lebih 1-2% dicampur dengan serbuk kering kalium bromide untuk dibuat menjadi pelet. Campuran dimasukkan kedalam alat cetakan pelet dan ditekan 10000-15000 pon per inci persegi menjadi sebuah cakram bening (pelet). Dibuat spektrum inframerah pada bilangan gelombang(ν)= 500-4000 cm^{-1} dan diidentifikasi pita absorpsi yang khas dari gugus fungsi pada spektrum infra merah.

4.6.6 Konfirmasi Struktur dengan Spektrometer Resonansi Magnet Inti (^1H -NMR)

Sedikit sampel dilarutkan dalam aseton *deuterated* (aseton- D_6) yang sudah mengandung tetrametisilan (TMS). Dibuat spektrum resonansi proton senyawa pada daerah geseran kimia 0-108. Diidentifikasi intensitas jumlah, posisi pada daerah geseran kimia puncak-puncak proton (^1H -NMR) pada spektrum resonansi magnet inti yang terjadi.

4.7 Prosedur Uji Aktivitas Analgesik

Uji aktivitas analgesik suatu obat baru ditentukan dengan cara mengamati jumlah geliatan yang dilakukan hewan coba akibat induksi suatu bahan pengiritasi pada bagian peritoneal dari hewan coba (*writhing test*). Pada penelitian ini, bahan kimia yang digunakan sebagai penginduksi nyeri ialah larutan asam asetat 0,6%.

4.7.1 Perhitungan Jumlah Hewan Coba

Mencit merupakan hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini, jumlah mencit yang digunakan untuk kelompok kontrol dan tiap dosis pada satu kelompok uji maupun pembanding dihitung dengan menggunakan rumus:

$$n = (Z\alpha - Z\beta)^2 \frac{S^2}{d^2}$$

keterangan:

n = jumlah sampel

$Z\alpha$ = harga standar distribusi normal untuk α tertentu

$Z\beta$ = harga standar distribusi normal untuk β tertentu

S = simpangan baku

d = penyimpangan yang ditoleransi terhadap μ normal

dalam tabel harga standar normal (Z) diketahui bahwa pada tingkat kesalahan 5%, harga $Z\alpha = 1,96$ dan $Z\beta = -1,645$. Harga simpangan baku didapatkan dari penelitian sebelumnya yaitu 7,7395 dan harga d yang ditetapkan peneliti sebesar 11,380. Sehingga berdasarkan hal tersebut maka jumlah sampel yang diperlukan dalam penelitian ini adalah:

$$n = 1,96 - -1,645 \quad \frac{7,7395^2}{11,380^2} = 6 \text{ mencit}$$

4.7.2 Persiapan Hewan Coba

Sejumlah mencit berbobot 20-30 gram dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu 1 kelompok uji Asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5 metoksi benzoat (100mg/kg); (25mg/kg) dan 1 kelompok pembanding asetosal (100mg/kg); (50mg/kg); (25mg/kg) dan 1 kelompok kontrol, masing-masing terdiri dari 6 ekor mencit. Sebelum percobaan, mencit dipuaskan semalam tetapi tetap diberi minum. Mencit pada kelompok uji akan diberi senyawa uji pada dosis 100mg/kg, 50mg/kg, 25 mg/kg sedangkan pada kelompok kontrol tidak diberi senyawa uji, hanya diberi larutan CMC Na 0,5%.

4.7.3 Pembuatan Larutan Asam Asetat 0,6%

Dipipet 0,6 ml asam asetat glasial lalu dimasukkan ke dalam labu ukur dan diencerkan dengan aqua pro injection sampai volume 100,0 ml. Larutan 0,6% inilah yang digunakan sebagai bahan penginduksi nyeri.

4.7.4 Pembuatan Suspensi CMC-Na 0,5%

Ditimbang 500 mg CMC-Na kemudian ditaburkan diatas aqua pro injeksi panas 30 ml dalam mortir dan dibiarkan hingga mengembang sekitar 10 menit. Kemudian dilakukan penggerusan dan pengenceran dengan aqua pro injeksi hingga volume 100 ml. Hasil akhir berupa musilago CMC-Na 0,5% yang digunakan sebagai kontrol.

4.7.5 Perhitungan Dosis

Dosis asam asetil salisilat dan asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat yang diberikan kepada mencit disesuaikan dengan bobot masing-masing mencit. Pemberian dosis ini dihitung melalui BSA atau *Body Surface Area* dan HED atau *Human Effective Dose*.

Tabel IV.1 Konversi dosis hewan coba ke HED berdasarkan BSA (Ken Wojcikowski *et al.*, 2013; Reagan-Shaw *et al.*, 2007)

Spesies	Berat (kg)	BSA (m ²)	Km Factor
Manusia	60	1,6	37
Anjing	10	0,5	20
Monyet	3	0,24	12
Kelinci	1,8	0,15	12
Marmut	0,4	0,05	8
Tikus	0,15	0,025	6
Hamster	0,08	0,02	5
Mencit	0,02	0,007	3

Digunakan rumus:

$$\text{HED } \frac{\text{mg}}{\text{kg}} = \text{Dosis pada hewan coba } \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) \times \frac{\text{Km pada hewan coba}}{\text{Km pada manusia}}$$

Dosis asetosal yang digunakan untuk nyeri adalah 300-900 mg tiap 4-6 jam, maksimum 4 gram sehari (BNF, 2014).

$$\text{HED asetosal} = \frac{500 \text{ mg}}{60 \text{ kg}} = 8,3 \frac{\text{mg}}{\text{kg}}$$

$$\text{dosis mencit} = \text{HED asetosal } \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \times \frac{\text{Km pada manusia}}{\text{Km pada hewan coba}}$$

$$\text{dosis mencit} = 8,3 \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \times \frac{37}{3} = 102 \frac{\text{mg}}{\text{kg}}$$

Didapatkan hasil untuk dosis mencit adalah 102 mg/kg, namun dilakukan pembulatan menjadi 100 mg/kg untuk memudahkan dalam perhitungan dosis.

Bobot mencit yang digunakan adalah 20-30 gram. Dosis senyawa uji yang digunakan adalah 100 mg/kg, 50 mg/kg, 25 mg/kg. Sehingga bila menggunakan bobot mencit 30 gram maka perhitungan dosisnya adalah sebagai berikut:

1. 25 mg/kg x 0,03 kg (Bobot mencit)= 0,75 mg
2. 50 mg/kg x 0,03 kg (Bobot mencit)= 1,5 mg
3. 100 mg/kg x 0,03 kg (Bobot mencit)= 3 mg

4.7.6 Pembuatan Sediaan Senyawa Uji

Sediaan uji yang dibuat adalah Asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat dengan pembanding asetosal. Senyawa dibuat dalam bentuk suspensi yang harus dalam keadaan baru jika akan diujikan karena tidak dapat disimpan untuk waktu yang lama. Uji potensi dilakukan dengan memberikan senyawa turunan asam salisilat dosis 25 mg, 50 mg, 100 mg/kg BB dalam suspensi CMC Na 0,5% sebanyak 10,0 mL. Jika berat mencit rata-rata 30 gram, maka dosis yang diberikan adalah 0,75 mg/30g BB, 1,5 mg/30g BB, dan 3,0 mg/30g BB.

Larutan A : Untuk pembuatan suspensi larutan uji dengan dosis 0,75 mg/30g BB, ditimbang 25,0 mg dan suspensikan

dalam larutan CMC Na 0,5% sampai 10,0 mL.

Larutan B : Untuk pembuatan suspensi larutan uji dengan dosis 1,5 mg/30g BB, ditimbang 50,0 mg dan suspensikan dalam larutan CMC Na 0,5% sampai 10,0 mL.

Larutan C : Untuk pembuatan suspensi larutan uji dengan dosis 3,0 mg/30g BB, ditimbang 100,0 mg dan suspensikan dalam larutan CMC Na 0,5% sampai 10,0 mL.

4.7.7 Pemberian Senyawa Uji

Untuk menghitung volume senyawa uji dan senyawa pembanding yang akan diberikan kepada mencit sesuai dengan dosis yang ditentukan, dapat menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\frac{\text{BB kg} \times \text{Dosis } \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}}\right)}{\text{Kadar sediaan}}$$

Jika berat mencit adalah 30,0 gram:

1. Untuk dosis 25 mg/kg (0,75 mg), volume larutan A yang akan diinjeksikan ke peritoneal mencit adalah:

$$\frac{0,75 \text{ mg}}{2,5 \text{ mg/ml}} = 0,3 \text{ mL}$$

2. Untuk dosis 50 mg/kg (0,75 mg), volume larutan A yang akan diinjeksikan ke peritoneal mencit adalah:

$$\frac{1,5 \text{ mg}}{5 \text{ mg/ml}} = 0,3 \text{ mL}$$

3. Untuk dosis 100 mg/kg (0,75 mg), volume larutan A yang akan diinjeksikan ke peritoneal mencit adalah:

$$\frac{3,0 \text{ mg}}{10 \text{ mg/ml}} = 0,3 \text{ mL}$$

4.7.8 Pelaksanaan Uji Aktivitas

Mencit dengan bobot tertentu diberi sediaan uji dosis 100 mg/kg; 50 mg/kg; 25 mg/kg secara intraperitoneal (i.p). 20 menit setelah pemberian sediaan, mencit disuntik dengan larutan asam asetat 0,6 % volume 0,01 ml/g berat badan secara i.p 5 menit kemudian diamati respon nyeri dari mencit yang berupa geliat selama 30 menit, sehingga diperoleh data frekuensi geliat kelompok kontrol, pembandingan, dan uji. Dari data penelitian kemudian dihitung nilai presentase hambatan nyeri dari tiap-tiap dosis.

4.8 Analisis Data

Anova digunakan untuk menganalisa sejumlah sampel dengan data yang sama pada tiap-tiap kelompok sampel, atau dengan jumlah yang berbeda. Anova mensyaratkan data penelitian dikelompokkan berdasarkan kriteria tertentu.

Analisis varian satu arah (*one way*) digunakan pada penelitian karena adanya perbedaan antara 3 atau lebih rata-rata populasi meliputi dosis, replikasi, dan aktivitas. Analisis varian

satu arah (*one way*) digunakan untuk melihat apakah ada perbedaan yang bermakna frekuensi geliat mencit kelompok kontrol, kelompok uji dan kelompok pembanding pada 3 dosis berbeda. Uji F dilakukan pada $\alpha = 0,05$ dengan hipotesis sebagai berikut :

H_0 = Tidak ada perbedaan yang bermakna frekuensi geliat antar kelompok uji, kelompok pembanding dan kelompok kontrol.

H_a = Ada perbedaan yang bermakna frekuensi geliat antar kelompok uji, kelompok pembanding dan kelompok kontrol.

Data yang diperoleh dari uji aktivitas dengan tiga dosis berbeda dari senyawa uji Asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat, senyawa pembanding (asetosal) dan kontrol (CMC-Na 0,5%), kemudian diolah secara statistik dengan bantuan program komputer SPSS 21.0, untuk menguji perbedaan kemaknaan dari kelompok-kelompok diatas. Kesimpulan diperoleh dari harga probabilitas (P) pada $\alpha = 0,05$. Apabila $P > 0,05$ maka H_0 diterima dan H_a ditolak. Sebaliknya bila $P < 0,05$ maka H_0 ditolak dan H_a diterima.

Dari data penelitian juga dapat ditentukan harga ED_{50} . Harga ED_{50} dihitung melalui persamaan regresi linear yang didapatkan antara kurva % hambat nyeri vs dosis dari kelompok uji maupun pembanding.

Persentase hambatan nyeri Asam 2-(4-klorobenzoiloksi) 5-metoksi benzoat dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ hambat nyeri} = \frac{f_k - f_r}{f_k} \times 100\% =$$

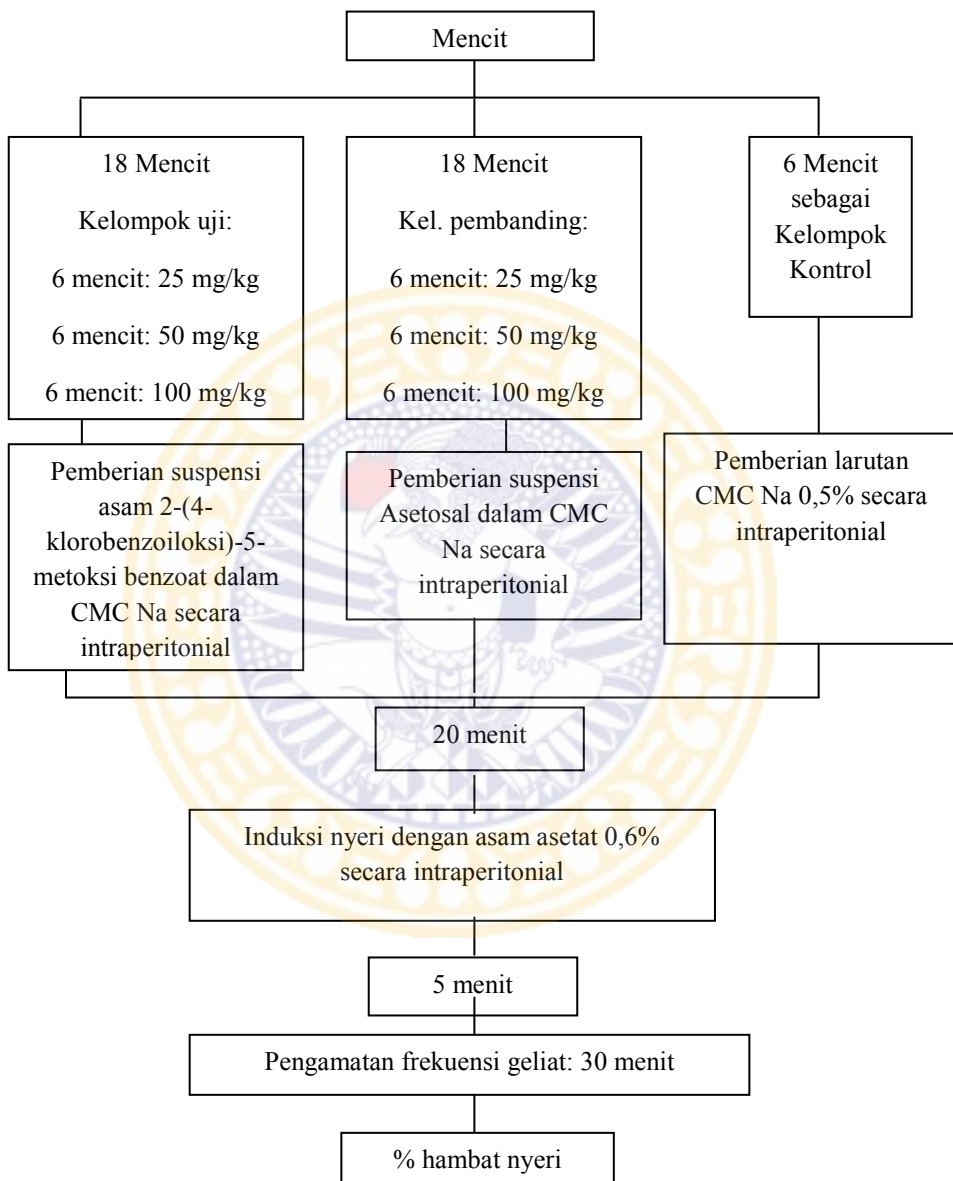
Keterangan:

f_k = frekuensi geliat rata-rata kelompok kontrol

f_r = frekuensi geliat rata-rata kelompok uji



BAGAN UJI AKTIVITAS ANALGESIK



Gambar 4.2 Bagan Uji Aktivitas Analgesik

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Sintesis Senyawa Asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-Metoksi Benzoat

Presentase hasil reaksi antara asam 5-metoksi salisilat dengan 4-klorobenzoil klorida adalah sebesar 44,20% dan berbentuk serbuk berwarna putih yang tidak larut dalam air namun larut dalam pelarut aseton dan metanol. Cara perhitungan presentase hasil dapat dilihat dalam lampiran 1.

5.2 Analisis Senyawa Hasil Sintesis

5.2.1 Pemeriksaan Organoleptis

Hasil pemeriksaan organoleptis senyawa hasil sintesis terdapat dalam tabel berikut:

Tabel V.1 Hasil Pemeriksaan Organoleptis

Pemeriksaan Organoleptis	Hasil Pengamatan
Bentuk	Serbuk padatan
Warna	Putih
Bau	Berbau khas

5.2.2 Uji Pemeriksaan Kemurnian

5.2.2.1 Penentuan Titik Lebur

Hasil pemeriksaan Titik lebur senyawa hasil sintesis dengan menggunakan Mel-Temp Electrothermal terdapat dalam tabel berikut:

Tabel V.2 Hasil Pemeriksaan Titik Lebur Senyawa Hasil Sintesis

Replikasi	Hasil Pengamatan titik lebur Senyawa Asam 5-metoksi salisilat (°C)	Hasil Pengamatan titik lebur Senyawa Hasil sintesis (°C)
I	147-148	192-194
II	147-148	192-194
III	147-148	192-193

5.2.2.2 Pemeriksaan Kemurnian dengan Kromatografi Lapis Tipis

Pemeriksaan kemurnian senyawa hasil sintesis dengan kromatografi lapis tipis menggunakan:

pelarut : etanol

fase diam : silica gel 60 GF 254

penampak noda : lampu UV 254 nm

fase gerak : tiga jenis eluen berbeda tingkat kepolaran

Hasil pemeriksaan kemurnian dengan kromatografi lapis tipis dengan tiga jenis eluen yang berbeda tingkat kepolaran menghasilkan satu noda pada fase gerak dengan nilai R_f

tertentu. Data mengenai Nilai Rf pada tiga jenis eluen terdapat dalam tabel berikut:

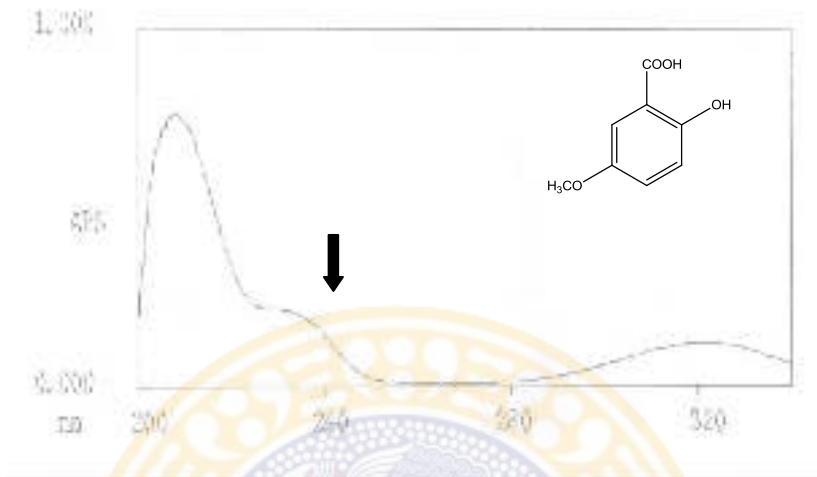
Tabel V.3 Nilai Rf pada Tiga Jenis Fase Gerak

Fase gerak	Nilai Rf	
	Senyawa Asam 5-metoksi salisilat	Senyawa Hasil sintesis
Etil Asetat: Metanol (7:3)	0,62	0,78
Kloroform: Aseton (7:3)	0,32	0,6
Kloroform : Metanol (3:2)	0,68	0,82

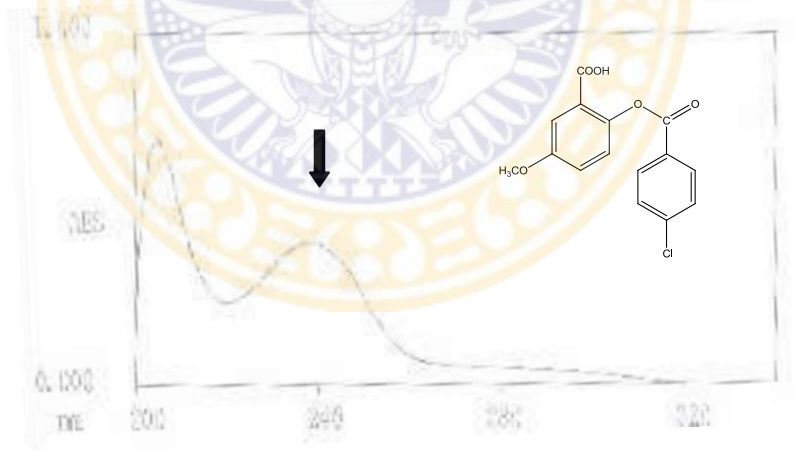
5.3 Konfirmasi Struktur

5.3.1 Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer UV-VIS

Spektrum Ultraviolet dari senyawa asam 5-metoksi salisilat dalam pelarut etanol terdapat dalam gambar 5.1 dan untuk spektrum Ultraviolet senyawa hasil sintesis yaitu asam-2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat pada gambar 5.2



Gambar 5.1 Spektrum Ultraviolet senyawa asam 5-metoksi salisilat



Gambar 5.2 Spektrum Ultraviolet senyawa asam-2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat

Dari gambar terlihat bahwa senyawa asam 5-metoksi salisilat memberikan puncak serapan maksimum pada λ (panjang gelombang) 231,8 nm sedang pada senyawa hasil sintesis pada panjang gelombang 238,8 nm. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi pergeseran panjang gelombang dan peningkatan intensitas serapan.

5.3.2 Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer Inframerah

Spektrum Inframerah dari senyawa asam 5-metoksi salisilat dalam pelet KBr terdapat dalam gambar 5.3 dan untuk spektrum Inframerah senyawa hasil sintesis yaitu asam-2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat pada gambar 5.4.

Tabel V.4 Karakteristik spektrum inframerah senyawa asam 5-metoksi salisilat dan senyawa hasil sintesis yaitu asam-2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat

Gugus Fungsi	Bilangan gelombang (cm^{-1})*	Bilangan gelombang pada asam 5-metoksi salisilat pada (cm^{-1})	Bilangan gelombang pada Asam-2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat (cm^{-1})
-C=O (ester)	1715-1730 (kuat)	-	1726,50
-C-Cl	600-800 (kuat)	-	749,69
-C=O (khas asam salisilat)	1665	1661,39	-
-O-H (fenolik)	3400-3650	3447,38	3459,35
-C=O (karboksilat)	1706-1720	-	1706,55
-C=C- (aromatis)	1450-1600 (medium)	1462,60	1451,70

*Pustaka: (Silverstein, 2005); (Pavia, 2009)

Dalam tabel V.4 terlihat bahwa terdapat perbedaan spektra inframerah antara senyawa asam 5-metoksi salisilat dengan senyawa hasil sintesis yaitu asam-2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat. Hal ini didukung dengan adanya serapan dengan intensitas kuat pada $1726,50 \text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan adanya gugus ester pada senyawa hasil sintesis sedang pada senyawa asam 5-metoksi salisilat tidak terdapat serapan pada panjang gelombang tersebut. Selain itu adanya serapan dengan intensitas kuat pada $749,69 \text{ cm}^{-1}$

memberikan petunjuk tentang adanya gugus -C-Cl pada senyawa hasil reaksi sintesis.



Tabel V.6 Karakteristik spektrum $^1\text{H-NMR}$ dari asam-2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat

δ (ppm)	Atom H pada	Multiplitas
8,14-8,12	-C-H benzena	Doublet
7,62-7,60	-C-H benzena	Doublet
7,54-7,53	-C-H benzena	Singlet
7,24-7,22	-C-H benzena	Doublet
3,86-3,85	-CH ₃ Metoksi	Singlet

Dari analisis terhadap spektrum $^1\text{H-NMR}$ kedua senyawa terdapat perbedaan jumlah sinyal dan kedudukan sinyal. Penambahan jumlah sinyal yang terjadi pada senyawa hasil sintesis yaitu asam-2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat ditunjukkan oleh geseran 8,14-8,12 ppm dan 7,24-7,22 ppm. Hal ini menunjukkan adanya penambahan gugus aromatis pada senyawa senyawa asal sehingga terbentuk senyawa hasil reaksi yaitu asam-2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat.

5.4 Uji Aktivitas Analgesik

5.4.1 Penentuan Frekuensi Geliat (Respon Nyeri)

Hasil pengamatan frekuensi geliat dari mencit yang diinduksi dengan asam asetat 0,6% 0,01 ml/g BB setelah 20 menit pemberian senyawa uji yaitu dari asam-2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat dan senyawa pembanding yaitu asam asetil salisilat (Asetosal) dalam suspensi CMC-Na pada dosis 25 mg, 50 mg, dan 100 mg/kg BB serta senyawa kontrol yang berupa CMC-Na 0,5% terdapat dalam tabel V.7.

Tabel V.7 Frekuensi geliat mencit pada kelompok senyawa uji yaitu dari asam-2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat dan senyawa pembanding yaitu asam asetil salisilat dalam suspensi CMC-Na serta senyawa kontrol CMC-Na 0,5%

No. Mencit	Frekuensi geliat mencit tiap kelompok dosis						
	Senyawa kontrol CMC-Na 0,5%	Dosis senyawa pembanding yaitu asam asetil salisilat (mg/kg BB)			senyawa uji yaitu dari asam-2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat (mg/kg BB)		
		25	50	100	25	50	100
1.	68	56	48	26	49	40	26
2.	70	55	49	25	51	39	28
3.	69	58	44	31	45	38	30
4.	74	57	49	31	48	36	24
5.	69	52	47	33	50	39	26
6.	68	59	44	29	46	41	31
rerata	69,67	56,17	46,83	29,17	48,17	38,83	27,50
SD	2,25	2,48	2,32	3,12	2,32	1,72	3,12

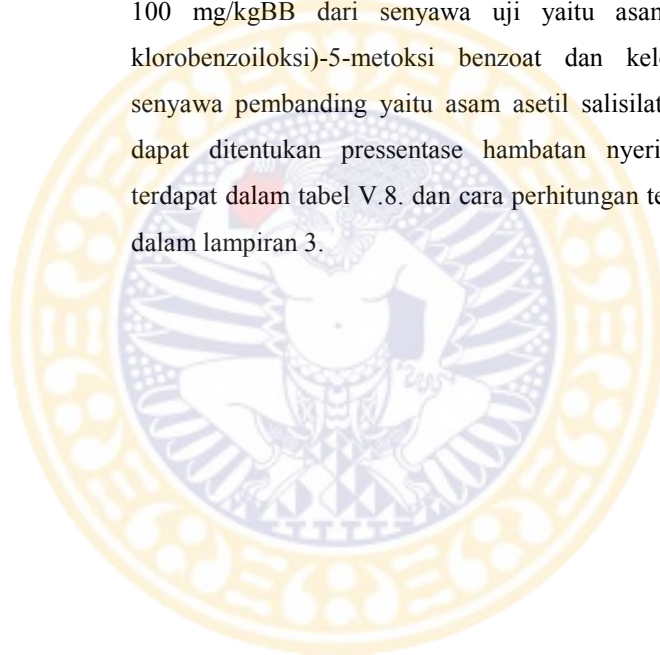
5.4.2 Analisis Data dengan Uji ANOVA

Uji ANOVA satu arah (*one way ANOVA*) dilakukan dengan menggunakan program SPSS 21.0 untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan kemaknaan antara kelompok kontrol, pembanding, dan uji pada $\alpha = 0,05$. Hasil perhitungan secara statistik didapat harga F hitung sebesar 224,611 yang lebih besar dari F tabel yaitu 2,37 dan nilai $P=0,00$. Nilai $P < \alpha$ (0,05) menunjukkan adanya perbedaan frekuensi geliatan yang bermakna antara kelompok kontrol CMC-

Na 0,5%, senyawa pembanding yaitu asam asetil salisilat dan senyawa uji asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat.

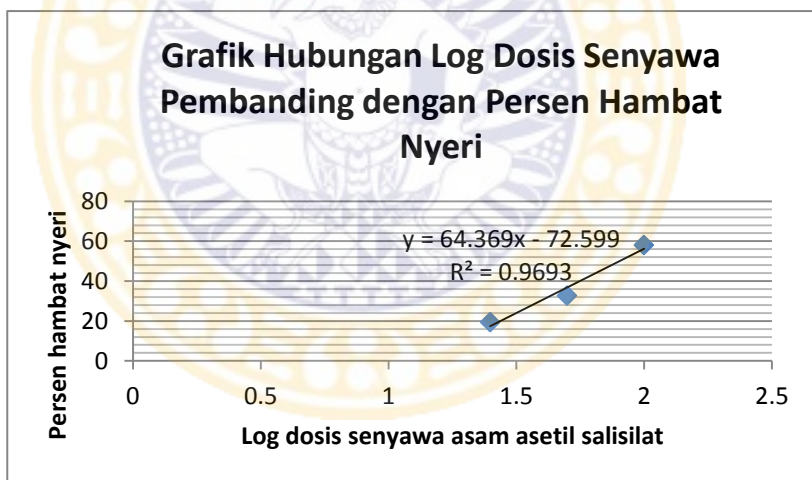
5.4.3 Perhitungan Presentase Hambat Nyeri

Berdasarkan data frekuensi geliat mencit tiap kelompok dosis pada 25 mg/kgBB, 50 mg/kgBB dan 100 mg/kgBB dari senyawa uji yaitu asam-2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat dan kelompok senyawa pembanding yaitu asam asetil salisilat maka dapat ditentukan presentase hambatan nyeri yang terdapat dalam tabel V.8. dan cara perhitungan terdapat dalam lampiran 3.

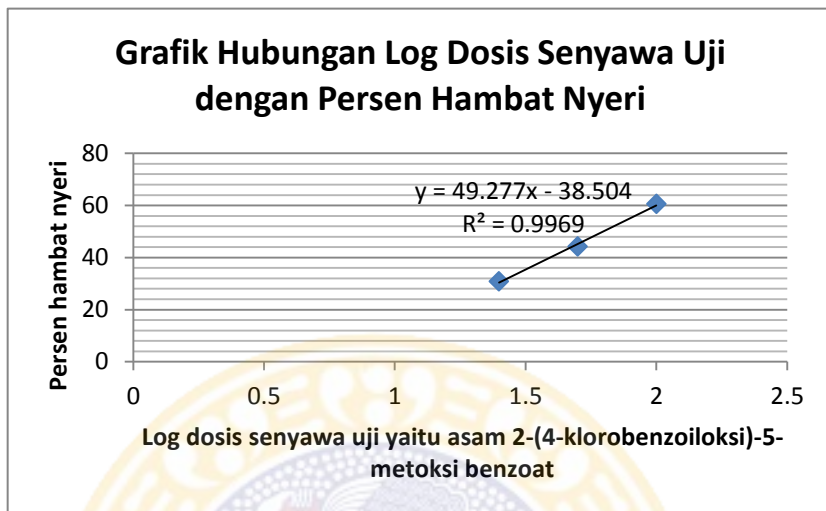


Tabel V.8 Persen hambat nyeri kelompok senyawa pembanding yaitu asam asetil salisilat dan senyawa uji yaitu asam-2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat

Dosis (mg/kg BB)	Rata-rata frekuensi geliat		Persen hambat nyeri	
	senyawa pembanding yaitu asam asetil salisilat	senyawa uji yaitu asam-2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat	senyawa pembanding yaitu asam asetil salisilat	senyawa uji yaitu asam-2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat
25	56,17	48,17	19,38	30,86
50	46,83	38,83	32,78	44,26
100	29,17	27,50	58,13	60,53



Gambar 5.7 Grafik hubungan antara log dosis dan persen hambat nyeri senyawa pembanding yaitu asam asetil salisilat



Gambar 5.8 Grafik hubungan antara log dosis dan persen hambat nyeri senyawa uji yaitu asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat

Tabel V.9 Harga ED_{50} Senyawa Pembanding (Asam asetil salisilat) dan Senyawa Asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat

Senyawa	ED_{50}
Asam asetil salisilat	80,28 mg/kgBB
Asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat	62,52 mg/kgBB

BAB VI

PEMBAHASAN

Nyeri merupakan perasaan sensori dan emosional yang tidak nyaman serta bersifat subyektif (Tjay dan Rahardja, 2002). Penggunaan obat anti nyeri (analgetika) yang hingga saat ini masih digunakan adalah aspirin atau asam asetil salisilat yang merupakan turunan asam salisilat. (Pottega, 2014) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa 68% dari 117 pasien yang menjadi responden percaya bahwa Aspirin cukup efektif dibanding dengan obat analgesik lain. Namun, dalam usaha untuk mendapatkan senyawa baru turunan asam salisilat dengan aktivitas yang lebih besar, maka modifikasi molekul merupakan salah satu metode yang dapat dilakukan saat ini (Siswandono dan Soekardjo, 2008).

Asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat merupakan hasil modifikasi struktur molekul senyawa turunan asam salisilat yaitu asam 5-metoksi salisilat yang direaksikan dengan 4-klorobenzoil klorida dengan metode Schotten-Bauman yang telah dimodifikasi dengan suatu mekanisme reaksi esterifikasi. Metode ini menggunakan tetrahidrofuran sebagai pelarut dan katalisator piridin yang berperan dalam penangkapan hasil samping reaksi yaitu HCl selama reaksi berlangsung (Diyah *et al.*, 2002). Presentase senyawa hasil sintesis Asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat yang didapatkan adalah

44,20%. Hasil randemen yang kurang dari 50% dikarenakan senyawa hasil sintesis sedikit larut dalam pelarut yang digunakan dalam proses rekristalisasi yang dalam penelitian ini digunakan metanol panas. Pertumbuhan kristal yang berlangsung lambat setelah proses rekristalisasi juga memberikan dampak yang cukup signifikan dalam berkurangnya senyawa hasil sintesis (Doherty *et al.*, 1997)

Senyawa hasil sintesis yang didapatkan berupa serbuk berwarna putih dan berbau khas, hal ini berbeda dengan senyawa asal yaitu asam 5-metoksi salisilat yang berbentuk serbuk dengan warna kekuningan. Penentuan titiklebur senyawa hasil sintesis dilakukan dengan menggunakan Mel-Temp Electrothermal. Titik lebur senyawa awal yaitu asam 5-metoksi salisilat adalah 147-148 °C, sedangkan untuk senyawa hasil sintesis adalah 192-194°C. Rentang jarak lebur yang tidak lebih dari 2,0°C menunjukkan bahwa senyawa telah terbebas dari pengotor (Pavia, 2009). Perbedaan secara organoleptis serta harga jarak lebur antara senyawa hasil sintesis dengan senyawa asam 5-metoksi salisilat memberikan petunjuk bahwa senyawa hasil sintesis berbeda dengan senyawa asal.

Hasil pemeriksaan kemurnian dengan KLT atau kromatografi lapis tipis menghasilkan nilai R_f (faktor retensi). Faktor retensi (R_f) dapat digunakan sebagai proses identifikasi terhadap suatu senyawa dengan membandingkan dengan harga R_f standar pada kondisi kromatografi yang sama (Grushka *and* Grinberg, 2009). Dalam penelitian ini, Senyawa hasil sintesis menghasilkan hanya satu noda yang muncul dalam plat dengan

harga Rf yang berbeda dengan senyawa asam 5-metoksi salisilat pada tiga macam campuran eluen. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis murni secara KLT. Selain itu, Rf senyawa hasil sintesis pada 3 macam campuran eluen memiliki harga Rf yang relatif lebih besar jika dibandingkan dengan Rf senyawa asal yaitu asam 5-metoksi salisilat, hal ini dikarenakan senyawa hasil sintesis yang bersifat lebih non polar akibat penambahan cincin aromatis setelah ester terbentuk.

Konfirmasi struktur senyawa dilakukan dengan berbagai metode. Spektrofotometri UV merupakan salah satu metode yang digunakan karena informasi yang diberikan adalah mengenai adanya struktur terkonjugasi dalam senyawa (McMurry, 2015). Senyawa asam 5-metoksi salisilat dalam etanol memberikan puncak serapan pada panjang gelombang 231,8 nm sedangkan senyawa hasil sintesis dalam etanol memberikan puncak serapan pada panjang gelombang 238,8 nm. Pada spektrum UV senyawa hasil sintesis, terjadi pergeseran panjang gelombang dari puncak serapan ke arah kanan atau mengalami pergeseran bathokromik dan terjadi peningkatan intensitas serapan, hal ini merupakan akibat adanya penambahan gugus aoksokrom yaitu atom klor yang terdapat pada cincin aromatis. Dalam spektrum UV terlihat pula bahwa pada senyawa asal terdapat puncak serapan pada panjang gelombang 208,6 nm dan pada senyawa hasil sintesis pada panjang gelombang 205,2 nm, hal ini diduga merupakan *cutoff* dari palarut yang digunakan yaitu etanol (Pavia, 2009). Selain itu, pada spektrum senyawa hasil sintesis terdapat puncak serapan pada panjang gelombang sekitar 299 nm. Hal ini menunjukkan tidak adanya

gugus OH fenolik pada senyawa hasil sintesis (Diyah *et al.*, 2014).

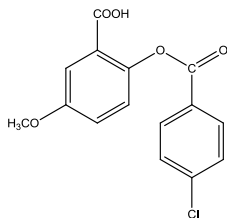
Spektrum Inframerah memberikan gambaran gugus fungsi dalam suatu molekul organik (McMurry, 2015). Terdapat perbedaan antara spektrum Infra merah dari senyawa asal dengan senyawa hasil sintesis. Pada senyawa awal tidak terdapat serapan dengan intensitas kuat pada bilangan gelombang antara $1715\text{--}1730\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan adanya gugus ester, sedang pada senyawa hasil sintesis terdapat serapan dengan intensitas kuat yang ditunjukkan pada bilangan gelombang $1726,50\text{ cm}^{-1}$ yang berarti bahwa ikatan --C=O ester telah terbentuk. Terbentuknya senyawa baru hasil sintesis diperkuat dengan tidak ditemukannya bilangan gelombang yang khas dari asam salisilat yaitu pada daerah 1665 cm^{-1} pada senyawa hasil sintesis (Silverstein, 2005).

Adanya serapan dengan intensitas kuat pada $749,69\text{ cm}^{-1}$ memberikan petunjuk tentang adanya gugus --C-Cl pada senyawa hasil sintesis. Gugus OH fenolik pada senyawa asam 5-metoksi ditunjukkan oleh bilangan gelombang $3447,38\text{ cm}^{-1}$ dan pada senyawa hasil sintesis juga terdapat serapan dengan intensitas yang sama pada bilangan gelombang $3459,35\text{ cm}^{-1}$. Keberadaan serapan pada bilangan gelombang $3459,35\text{ cm}^{-1}$ pada senyawa hasil sintesis adalah akibat ikatan intramolekular yang terjadi antara OH karboksilat dengan C-O ester yang terbentuk (Silverstein, 2005). Hal ini yang menyebabkan bilangan gelombang antara OH fenolik dengan OH karboksilat tidak dapat dibedakan pada spektrum IR dari senyawa hasil sintesis.

Perbedaan gugus fungsi yang ditunjukkan oleh spektrum IR antara senyawa asam 5-metoksi salisilat dengan senyawa hasil sintesis menunjukkan bahwa struktur molekul antara kedua senyawa berbeda.

Konfirmasi struktur dengan metode Spektroskopi H-NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) memberikan informasi terkait *mapping* kerangka molekul hidrogen dari suatu senyawa (Solomons, 2014). Dari analisis terhadap spektrum ^1H -NMR kedua senyawa terdapat perbedaan jumlah sinyal dan kedudukan sinyal. Penambahan jumlah sinyal yang terjadi pada senyawa hasil sintesis yaitu asam-2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat ditunjukkan oleh geseran 8,148-8,115 ppm dan 7,243-7,229 ppm. Hal ini menunjukkan adanya penambahan gugus aromatis pada senyawa senyawa asal dan terbentuk senyawa hasil baru hasil sintesis yaitu asam-2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat.

Berdasarkan konfirmasi struktur yang telah dilakukan dalam penelitian ini, maka struktur senyawa hasil sintesis dapat digambarkan dalam gambar 6.1



Gambar 6.1 Struktur senyawa hasil sintesis yaitu asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat

Untuk mengetahui aktivitas analgesik senyawa hasil sintesis, maka dilakukan uji aktivitas analgesik dengan menggunakan metode *writhing test* dan hewan coba mencit (*Mus musculus*). Metode *writhing test* dilakukan untuk menguji kemampuan obat analgesik baru dalam mencegah terjadinya geliatan dari injeksi intraperitoneal pada mencit dengan suatu bahan pengiritasi seperti asam asetat (Canon, 2007). Asam asetat digunakan sebagai bahan pengiritasi karena bekerja secara tidak langsung menimbulkan rilisnya mediator endogen pada saraf perifer dan menstimulasi saraf nyeri yang sensitif terhadap senyawa analgetika NSAID (Fadeyi, *et al.*, 2004).

Pada uji aktivitas analgesik, senyawa uji maupun pembanding yang dalam hal ini adalah asam asetil salisilat diberikan secara intraperitoneal dalam 20 menit sebelum injeksi asam asetat 0,6% untuk mengoptimalkan absorpsi senyawa uji atau pembanding oleh hewan coba. Pengamatan kemudian dilakukan selama 30 menit setelah 5 menit larutan asam asetat diinjeksikan. Dari hasil pengamatan, diketahui bahwa frekuensi geliat (respon nyeri) pada kelompok uji senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat cenderung lebih sedikit bila

dibandingkan dengan senyawa pembanding asam asetil salisilat atau asetosal dan kelompok control CMC Na 0.5%. Untuk mengetahui adanya perbedaan antara ketiga kelompok tersebut maka dilakukan analisis menggunakan Uji ANOVA satu arah (*one way ANOVA*) dengan IBM SPSS *Statistic* 21 untuk pada $\alpha = 0,05$. Hasil perhitungan secara statistik didapat harga F hitung sebesar 224,611 dan nilai $P = 0,00$. Nilai $P < \alpha$ (0,05) menunjukkan adanya perbedaan frekuensi geliatan yang bermakna antar kelompok.

Harga persen hambat nyeri untuk suatu kelompok dalam tiap-tiap dosis dapat dihitung dari data frekuensi geliatan mencit. Pada kelompok senyawa uji dosis 25 mg/kgBB, didapatkan harga persen hambat nyeri sebesar 30,86% dan untuk dosis 50 mg/kgBB serta 100 mg/kgBB masing-masing adalah 44,26% dan 60,53%. Sedangkan persen hambat nyeri kelompok pembanding asam asetil salisilat atau asetosal pada dosis 25 mg/kgBB didapatkan harga 19,38% dan pada dosis 50 mg/kgBB serta 100 mg/kgBB masing-masing adalah 32,78% dan 58,13%. Hasil persen hambat nyeri untuk senyawa uji asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat lebih besar dibanding senyawa pembanding asam asetil salisilat atau asetosal pada tiap kelompok dosis. Berdasarkan data tersebut, dapat dibuat kurva antara log dosis vs persen hambat nyeri pada kelompok senyawa uji asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat dan kelompok senyawa pembanding asetosal. Hasil ED_{50} dari senyawa uji adalah sebesar 62,52 mg/kgBB dan untuk ED_{50} senyawa pembanding yang dalam penelitian ini asam asetil salisilat atau asetosal adalah 80,28 mg/kgBB. Maka berdasarkan

hasil tersebut, senyawa uji asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat memiliki aktivitas analgesik yang lebih besar dibanding asetosal. Hal ini mendukung teori bahwa peningkatan harga log P yang merupakan salah satu parameter lipofilik dalam suatu senyawa menyebabkan peningkatan penembusan senyawa ke dalam membran biologis dan menyebabkan peningkatan jumlah senyawa yang berinteraksi dengan reseptor sehingga aktivitas biologis menjadi lebih besar.



BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Pada penelitian mengenai sintesis senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat dan uji aktivitas analgesiknya pada mencit (*Mus musculus*) yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Reaksi esterifikasi antara senyawa asam-5-metoksi salisilat dengan 4-klorobenzoil klorida dapat berlangsung dan menghasilkan senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat dengan rendemen sebesar 44,20%.
2. Senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat memiliki aktivitas analgesik yang lebih besar bila dibandingkan dengan asam asetil salisilat pada mencit (*Mus musculus*) dengan metode *writhing test*.

7.2 Saran

Dengan keberhasilan disintesisnya senyawa baru yaitu asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat yang memiliki efek analgesik yang lebih besar bila dibanding dengan asam asetil salisilat, maka peneliti merekomendasikan untuk dilakukan penelitian lanjutan mengenai uji toksisitas, stabilitas, dan sifat farmakokinetik senyawa asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat.

DAFTAR PUSTAKA

- American Hospital Formulary Services, 2005, *AHFS Drug Information*, American Society of Health-System Pharmacists Inc., USA.
- Bassols, Antònia, Fèlix Bosch, and Josep-eladi Baños. 2002. "How Does the General Population Treat Their Pain ? A Survey in Catalonia , Spain." 23(4):318–28.
- Barret, K. E., S. Boitano, M. R. Barman, and H. L. Brooks. 2010. *Ganong's Review of Medical Phsycology*. 23rd Edition. USA: McGraw-Hill Comp.
- Budavari, S. (Ed). 2006. *The Merck Index*. 14th edition. New York: Merck & Co Inc.
- Canon, J. G. 2007. *Pharmacology for Chemists*. Second Edition. Oxford University Press.
- Chang, H. Y., Matthew Daubresse, Stefan P. Kruszewski, and G. Caleb Alexander. 2014. "Prevalence and Treatment of Pain in EDs in the United States, 2000 to 2010." *The American journal of emergency medicine* 32(5):421–31. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24560834>).
- Davey, Patrick. 2002. *At a Glance Medicine*. Blackwell Science Ltd.
- Diyah, N. Z dan Siswandono. 2014. "Docking Molekul Dan Sintesis Turunan Asam Benzoil Salisilat Tersubstitusi Klor Sebagai Penghambat Sikloogenase." *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi* 3.
- Doherty, R. D. et al. 1997. "Current Issues in Recrystallization : A Review." 238:219–74.
- Ekinci, Deniz, Murat Şentürk, and Ömer İrfan Küfrevioğlu. 2011. "Salicylic Acid Derivatives: Synthesis, Features and Usage as Therapeutic Tools." *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 21(12):1831–41.

- Fadeyi, O. O., C. A. Obafemi, C. O. Adewunmi, and E. O. Iwalewa. 2004. "Effects of Four Derivatives of Salicylic Acid and Anthranilic Acid in Mice and Rats." 3(August):426–31.
- Fessenden, R. J. 1998. *Organic Chemistry*. Sixth Edition. USA: Brooks/Cole.
- Galla, R. K. V. S. R. G. Prasad, Amineni Umamaheswari Dibyabhava Pradhan Koganti Bharathi. 2014. "Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Docking Studies of N-(α -Acetamido Cinnamoyl) Aryl Hydrazone Derivatives as Antiinflammatory and Analgesic Agents." *Medicinal Chemistry Research* 5204–14.
- Grushka, Eli and Nelu Grinberg. 2009. *Advances in Chromatography, Volume 47*. CRC Press.
- Kar, Ashutosh. 2007. *Medicinal Chemistry*. Fourth Edition. New Delhi: New Age International (P) Limited.
- Katzung, B.G., Masters, S.B., Trevor, A.J. 2014. Basic & Clinical Pharmacology, Thirteenth Edition. New York:McGraw-Hill.
- McMurry, John. 2015. *Organic Chemistry*. Ninth Edit. Boston: Cengage Learning.
- Morrison, R. T. and Robert N. Boyd. 1992. *Organic Chemistry*. Sixth Edition. New York: Irving Geis and Harper and Row.
- Nayak, P. S., B. Narayana, B. K. Sarojini, Karunakara Hegde, and K. S. Shashidhara. 2014. "Design and Synthesis of Novel Heterocyclic Acetamide Derivatives for Potential Analgesic, Anti-Inflammatory, and Antimicrobial Activities." *Medicinal Chemistry Research* 23(9):4280–94. Retrieved (<http://link.springer.com/10.1007/s00044-014-1003-3>).
- Pavia, D. L., Gary M. Lampman, George S. Kriz, and James R. Vyvyan. 2009. *Introduction to Spectroscopy*. Forth Edit. Belmont: Brooke/Cole, Cengage Learning.

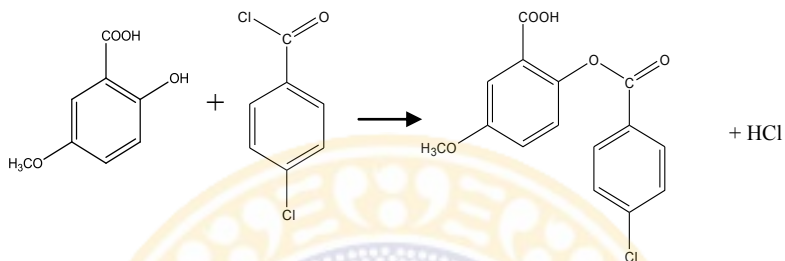
- Pottega, Anton. 2014. "Patient Characteristics among Users of Analgesic over-the-Counter Aspirin in a Danish Pharmacy Setting." 693–96.
- Reagan-Shaw, Shannon, Minakshi Nihal, and Nihal Ahmad. 2008. "Dose Translation from Animal to Human Studies Revisited." *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22(3):659–61.
- Schenone, Silvia et al. 2006. "New 1,3,4-Thiadiazole Derivatives Endowed with Analgesic and Anti-Inflammatory Activities." *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 14(6):1698–1705.
- Schoffstall, A. M. 2000. *Microscale and Miniscale Organic Chemistry Laboratory Experiment*. First Edit. The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Silverstein, R. M., Francis X. Webster, and David J. Kiemle. 2005. *Spectrometric Identification of Organic Compound*. Seventh Ed. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Siswandono dan Bambang Soekardjo. 2008. *Kimia Medisinal Jilid 1*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Siswandono dan Bambang Soekardjo. 2008. *Kimia Medisinal Jilid 2*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Solomons, T. W. Graham, Craig B. Fryhle, and Scoot A. Synder. 2014. *Organic Chemistry*. Eleventh Edition. Hoboken, NJ: Wiley.
- Tjay, T.H. dan Rahardja, K. 2002. *Obat-Obat Penting*. Jakarta: PT Gramedia.
- Vogel, H. G. 2008. *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*. Third Edition. edited by V. Hans. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Wilson, I. D. 1999. "The State of the Art in Thin-Layer Chromatography – Mass Spectrometry : A Critical Appraisal." 856:429–42.

- Wojcikowski, Ken and Glenda Gobe. 2014. "Animal Studies on Medicinal Herbs: Predictability, Dose Conversion and Potential Value." *Phytotherapy research : PTR* 28(1):22–27. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23553964>).



LAMPIRAN 1

PRESENTASE PERHITUNGAN HASIL SINTESIS



Asam 5-metoksi
salisilat

$2,3788 \times 10^{-3}$ mol

0,4000 g

4-klorobenzoil
klorida

$7,7996 \times 10^{-3}$ mol

1 ml

Asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-
metoksi benzoat

$2,3788 \times 10^{-3}$ mol

0,7296 g

Berat senyawa secara teoritis : 0,7296 gram

Berat senyawa hasil sintesis : 0,3225 gram

Presentase hasil : $\frac{0,3225}{0,7296} \times 100\% = 44,20\%$

LAMPIRAN 2

GAMBAR HEWAN COBA SAAT UJI AKTIVITAS ANALGESIK



Gambar 6.1 Hewan coba sebelum diberikan perlakuan



Gambar 6.2 Hewan coba saat diinjeksi dengan senyawa uji, pembanding atau kontrol



Gambar 6.3 Hewan coba setelah diberikan perlakuan yaitu diinjeksi dengan senyawa asam asetat 0,6%

LAMPIRAN 3

PERHITUNGAN PERSEN HAMBAT NYERI

Persentase hambatan nyeri dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ hambat nyeri} = \frac{fk - fr}{fk} \times 100\% =$$

Keterangan:

fk= frekuensi geliat rata-rata kelompok kontrol

fr= frekuensi geliat rata-rata kelompok uji

A. Persentase hambatan nyeri Senyawa pembanding yaitu asam asetil salisilat (asetosal)

1. Dosis 25 mg/kgBB

$$\% \text{ hambat nyeri} = \frac{69,67 - 56,17}{69,67} \times 100\% = 19,37 \%$$

2. Dosis 50 mg/kgBB

$$\% \text{ hambat nyeri} = \frac{69,67 - 46,83}{69,67} \times 100\% = 32,78 \%$$

3. Dosis 100 mg/kgBB

$$\% \text{ hambat nyeri} = \frac{69,67 - 29,17}{69,67} \times 100\% = 58,13 \%$$

B. Persentase hambatan nyeri Senyawa uji yaitu asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat

1. Dosis 25 mg/kgBB

$$\% \text{ hambat nyeri} = \frac{69,67 - 48,17}{69,67} \times 100\% = 30,86 \%$$

2. Dosis 50 mg/kgBB

$$\% \text{ hambat nyeri} = \frac{69,67 - 38,83}{69,67} \times 100\% = 44,26 \%$$

3. Dosis 100 mg/kgBB

$$\% \text{ hambat nyeri} = \frac{69,67 - 27,5}{69,67} \times 100\% = 60,53\%$$



LAMPIRAN 4

TABEL STATISTIKA

Tabel Persentase Distribusi F untuk Probabilitas = 0,05															
df untuk penyebut (n2)	df untuk pembilang (n1)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	161	199	216	225	232	238	243	247	250	253	255	257	259	260	261
2	18.51	10.00	10.16	10.25	10.33	10.39	10.45	10.50	10.54	10.58	10.61	10.64	10.67	10.69	10.71
3	10.13	5.99	6.00	6.03	6.07	6.10	6.13	6.16	6.19	6.22	6.25	6.27	6.29	6.31	6.33
4	7.71	5.04	5.05	5.07	5.09	5.11	5.13	5.15	5.17	5.19	5.21	5.23	5.24	5.26	5.27
5	6.61	4.75	4.76	4.77	4.79	4.80	4.82	4.83	4.85	4.86	4.88	4.89	4.90	4.92	4.93
6	5.99	4.54	4.55	4.56	4.58	4.59	4.61	4.62	4.64	4.65	4.67	4.68	4.69	4.71	4.72
7	5.59	4.34	4.35	4.36	4.37	4.39	4.40	4.42	4.43	4.44	4.46	4.47	4.48	4.50	4.51
8	5.32	4.16	4.17	4.18	4.20	4.21	4.23	4.24	4.25	4.27	4.28	4.29	4.30	4.32	4.33
9	5.12	4.08	4.09	4.10	4.12	4.13	4.15	4.16	4.17	4.19	4.20	4.21	4.22	4.24	4.25
10	4.96	4.00	4.01	4.02	4.04	4.05	4.07	4.08	4.09	4.11	4.12	4.13	4.14	4.16	4.17
11	4.84	3.98	3.99	4.00	4.02	4.03	4.05	4.06	4.07	4.09	4.10	4.11	4.12	4.14	4.15
12	4.74	3.96	3.97	3.98	4.00	4.01	4.03	4.04	4.05	4.07	4.08	4.09	4.10	4.12	4.13
13	4.67	3.91	3.92	3.93	3.95	3.96	4.00	4.01	4.02	4.04	4.05	4.06	4.07	4.09	4.10
14	4.60	3.84	3.85	3.86	3.88	3.89	3.91	3.92	3.93	4.00	4.01	4.02	4.03	4.05	4.06
15	4.54	3.80	3.81	3.82	3.84	3.85	3.87	3.88	3.89	3.91	3.92	3.93	3.94	4.00	4.01
16	4.49	3.76	3.77	3.78	3.80	3.81	3.83	3.84	3.85	3.87	3.88	3.89	3.90	3.92	3.93
17	4.45	3.74	3.75	3.76	3.78	3.79	3.81	3.82	3.83	3.85	3.86	3.87	3.88	3.90	3.91
18	4.41	3.70	3.71	3.72	3.74	3.75	3.77	3.78	3.79	3.81	3.82	3.83	3.84	3.86	3.87
19	4.38	3.68	3.69	3.70	3.72	3.73	3.75	3.76	3.77	3.79	3.80	3.81	3.82	3.84	3.85
20	4.35	3.66	3.67	3.68	3.70	3.71	3.73	3.74	3.75	3.77	3.78	3.79	3.80	3.82	3.83
21	4.32	3.64	3.65	3.66	3.68	3.69	3.71	3.72	3.73	3.75	3.76	3.77	3.78	3.80	3.81
22	4.30	3.64	3.65	3.66	3.68	3.69	3.71	3.72	3.73	3.75	3.76	3.77	3.78	3.80	3.81
23	4.28	3.62	3.63	3.64	3.66	3.67	3.69	3.70	3.71	3.73	3.74	3.75	3.76	3.78	3.79
24	4.26	3.62	3.63	3.64	3.66	3.67	3.69	3.70	3.71	3.73	3.74	3.75	3.76	3.78	3.79
25	4.24	3.60	3.61	3.62	3.64	3.65	3.67	3.68	3.69	3.71	3.72	3.73	3.74	3.76	3.77
26	4.23	3.59	3.60	3.61	3.63	3.64	3.66	3.67	3.68	3.70	3.71	3.72	3.73	3.75	3.76
27	4.21	3.58	3.59	3.60	3.62	3.63	3.65	3.66	3.67	3.69	3.70	3.71	3.72	3.74	3.75
28	4.20	3.57	3.58	3.59	3.61	3.62	3.64	3.65	3.66	3.68	3.69	3.70	3.71	3.73	3.74
29	4.19	3.56	3.57	3.58	3.60	3.61	3.63	3.64	3.65	3.67	3.68	3.69	3.70	3.72	3.73
30	4.17	3.55	3.56	3.57	3.59	3.60	3.62	3.63	3.64	3.66	3.67	3.68	3.69	3.71	3.72
31	4.16	3.54	3.55	3.56	3.58	3.59	3.61	3.62	3.63	3.65	3.66	3.67	3.68	3.70	3.71
32	4.15	3.53	3.54	3.55	3.57	3.58	3.60	3.61	3.62	3.64	3.65	3.66	3.67	3.69	3.70
33	4.14	3.52	3.53	3.54	3.56	3.57	3.59	3.60	3.61	3.63	3.64	3.65	3.66	3.68	3.69
34	4.13	3.51	3.52	3.53	3.55	3.56	3.58	3.59	3.60	3.62	3.63	3.64	3.65	3.67	3.68
35	4.12	3.50	3.51	3.52	3.54	3.55	3.57	3.58	3.59	3.61	3.62	3.63	3.64	3.66	3.67
36	4.11	3.49	3.50	3.51	3.53	3.54	3.56	3.57	3.58	3.60	3.61	3.62	3.63	3.65	3.66
37	4.11	3.48	3.49	3.50	3.52	3.53	3.55	3.56	3.57	3.59	3.60	3.61	3.62	3.64	3.65
38	4.10	3.47	3.48	3.49	3.51	3.52	3.54	3.55	3.56	3.58	3.59	3.60	3.61	3.63	3.64
39	4.09	3.46	3.47	3.48	3.50	3.51	3.53	3.54	3.55	3.57	3.58	3.59	3.60	3.62	3.63
40	4.08	3.45	3.46	3.47	3.49	3.50	3.52	3.53	3.54	3.56	3.57	3.58	3.59	3.61	3.62
41	4.08	3.44	3.45	3.46	3.48	3.49	3.51	3.52	3.53	3.55	3.56	3.57	3.58	3.60	3.61
42	4.07	3.43	3.44	3.45	3.47	3.48	3.50	3.51	3.52	3.54	3.55	3.56	3.57	3.59	3.60

LAMPIRAN 5

Hasil perhitungan ANOVA dan LSD Antara Kelompok Dosis Senyawa Asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat dengan Kelompok Dosis Senyawa Pembanding Asam asetil salisilat, serta dengan Kelompok Kontrol CMC-Na 0,5%

Tabel Deskripsi Rata-rata, Standar Deviasi Kelompok Dosis Senyawa Pembanding Asam asetil salisilat, Senyawa Uji Asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat, serta Kelompok Kontrol CMC-Na 0,5%

Descriptives

Geliatan

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Senyawa Kontrol	6	69.6667	2.25093	.91894	67.3045	72.0289	68.00	74.00
aset-25mg	6	56.1667	2.48328	1.01379	53.5606	58.7727	52.00	59.00
aset-50mg	6	46.8333	2.31661	.94575	44.4022	49.2645	44.00	49.00
aset-100mg	6	29.1667	3.12517	1.27584	25.8870	32.4463	25.00	33.00
uji-25mg	6	48.1667	2.31661	.94575	45.7355	50.5978	45.00	51.00
uji-50mg	6	38.8333	1.72240	.70317	37.0258	40.6409	36.00	41.00
uji-100mg	6	27.5000	2.66458	1.08781	24.7037	30.2963	24.00	31.00
Total	42	45.1905	14.19075	2.18968	40.7683	49.6126	24.00	74.00

Tabel ANOVA kelompok Dosis Senyawa Pembanding Asam asetil salisilat, Senyawa uji Asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat, dan Kelompok Kontrol CMC-Na 0,5%

ANOVA

Geliatan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8047.476	6	1341.246	224.611	.000
Within Groups	209.000	35	5.971		
Total	8256.476	41			

Tabel LSD Kelompok Dosis Senyawa Pembanding Asam asetil salisilat, Senyawa uji Asam 2-(4-klorobenzoiloksi)-5-metoksi benzoat, dan Kelompok Kontrol CMC-Na 0,5%

Multiple Comparisons

Geliatan

(I) Dosis	(J) Dosis	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Senyawa Kontrol	aset-25mg	13.50000 [*]	1.41084	.000	10.6358	16.3642
	aset-50mg	22.83333 [*]	1.41084	.000	19.9692	25.6975
	aset-100mg	40.50000 [*]	1.41084	.000	37.6358	43.3642
	uji-25mg	21.50000 [*]	1.41084	.000	18.6358	24.3642
	uji-50mg	30.83333 [*]	1.41084	.000	27.9692	33.6975
	uji-100mg	42.16667 [*]	1.41084	.000	39.3025	45.0308
aset-25mg	Senyawa Kontrol	-13.50000 [*]	1.41084	.000	-16.3642	-10.6358
	aset-50mg	9.33333 [*]	1.41084	.000	6.4692	12.1975
	aset-100mg	27.00000 [*]	1.41084	.000	24.1358	29.8642
	uji-25mg	8.00000 [*]	1.41084	.000	5.1358	10.8642
	uji-50mg	17.33333 [*]	1.41084	.000	14.4692	20.1975
	uji-100mg	28.66667 [*]	1.41084	.000	25.8025	31.5308
aset-50mg	Senyawa Kontrol	-22.83333 [*]	1.41084	.000	-25.6975	-19.9692
	aset-25mg	-9.33333 [*]	1.41084	.000	-12.1975	-6.4692
	aset-100mg	17.66667 [*]	1.41084	.000	14.8025	20.5308
	uji-25mg	-1.33333	1.41084	.351	-4.1975	1.5308

	uji-50mg	8.00000 ⁺	1.41084	.000	5.1358	10.8642
	uji-100mg	19.33333 ⁺	1.41084	.000	16.4692	22.1975
aset-100mg	Senyawa	-40.50000 ⁺	1.41084	.000	-43.3642	-37.6358
	Kontrol					
	aset-25mg	-27.00000 ⁺	1.41084	.000	-29.8642	-24.1358
	aset-50mg	-17.66667 ⁺	1.41084	.000	-20.5308	-14.8025
	uji-25mg	-19.00000 ⁺	1.41084	.000	-21.8642	-16.1358
	uji-50mg	-9.66667 ⁺	1.41084	.000	-12.5308	-6.8025
	uji-100mg	1.66667	1.41084	.245	-1.1975	4.5308
uji-25mg	Senyawa	-21.50000 ⁺	1.41084	.000	-24.3642	-18.6358
	Kontrol					
	aset-25mg	-8.00000 ⁺	1.41084	.000	-10.8642	-5.1358
	aset-50mg	1.33333	1.41084	.351	-1.5308	4.1975
	aset-100mg	19.00000 ⁺	1.41084	.000	16.1358	21.8642
	uji-50mg	9.33333 ⁺	1.41084	.000	6.4692	12.1975
	uji-100mg	20.66667 ⁺	1.41084	.000	17.8025	23.5308
uji-50mg	Senyawa	-30.83333 ⁺	1.41084	.000	-33.6975	-27.9692
	Kontrol					
	aset-25mg	-17.33333 ⁺	1.41084	.000	-20.1975	-14.4692
	aset-50mg	-8.00000 ⁺	1.41084	.000	-10.8642	-5.1358
	aset-100mg	9.66667 ⁺	1.41084	.000	6.8025	12.5308
	uji-25mg	-9.33333 ⁺	1.41084	.000	-12.1975	-6.4692
	uji-100mg	11.33333 ⁺	1.41084	.000	8.4692	14.1975
uji-100mg	Senyawa	-42.16667 ⁺	1.41084	.000	-45.0308	-39.3025
	Kontrol					

aset-25mg	-28.66667*	1.41084	.000	-31.5308	-25.8025
aset-50mg	-19.33333*	1.41084	.000	-22.1975	-16.4692
aset-100mg	-1.66667	1.41084	.245	-4.5308	1.1975
uji-25mg	-20.66667*	1.41084	.000	-23.5308	-17.8025
uji-50mg	-11.33333*	1.41084	.000	-14.1975	-8.4692

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



LAMPIRAN 6

PERHITUNGAN REGRESI

A. Regresi antara log dosis vs persen hambat nyeri asetosal

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.984 ^a	.969	.938	4.881

a. Predictors: (Constant), Log_Dosis

ANOVA^b

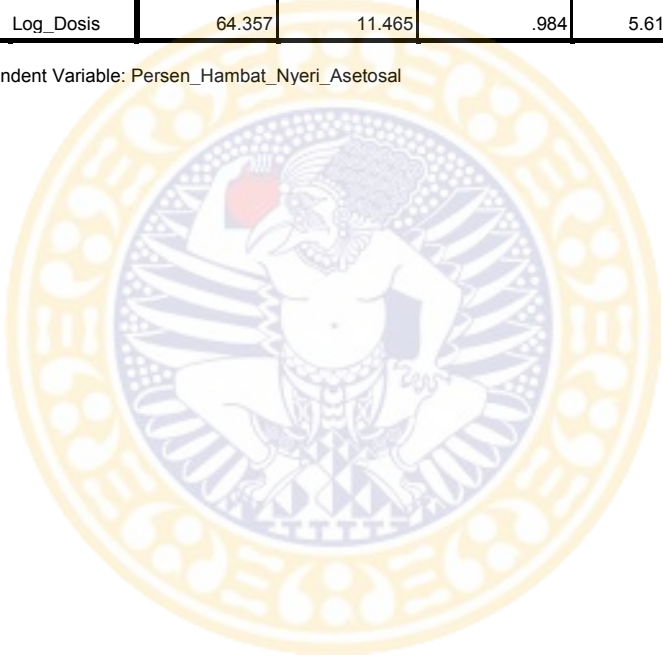
Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	750.756	1	750.756	31.510	.112 ^a
	Residual	23.826	1	23.826		
	Total	774.582	2			

a. Predictors: (Constant), Log_Dosis

b. Dependent Variable: Persen_Hambat_Nyeri_Asetosal

Coefficients ^a					
		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	
		B	Std. Error	Beta	
Model					
1	(Constant)	-72.577	19.681		-3.688 .169
	Log_Dosis	64.357	11.465	.984	5.613 .112

a. Dependent Variable: Persen_Hambat_Nyeri_Asetosal



B. Perhitungan Regresi antara Log dosis vs Persen Hambat Nyeri Senyawa Uji

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.998 ^a	.997	.994	1.1736843

a. Predictors: (Constant), Log_Dosis

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	440.150	1	440.150	319.520	.036 ^a
	Residual	1.378	1	1.378		
	Total	441.527	2			

a. Predictors: (Constant), Log_Dosis

b. Dependent Variable: Persen_Hambat_Nyeri_Seny_Uji

Coefficients^a

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
1 (Constant)	-38.504	4.732		-8.136	.078
Log_Dosis	49.277	2.757	.998	17.875	.036

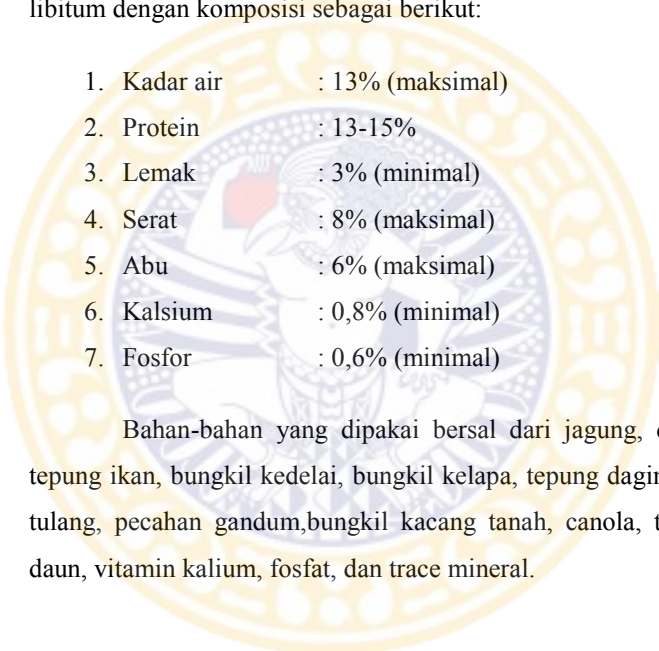
a. Dependent Variable: Persen_Hambat_Nyeri_Seny_Uji



LAMPIRAN 7

PAKAN HEWAN COBA

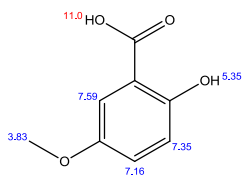
Jenis makanan berupa pellet yang dibuat berdasarkan pakan tikus standar sesuai dengan standar dari PT. Charoen Pokphand Sidoarjo, Indonesia. Makanan diberikan secara *ad libitum* dengan komposisi sebagai berikut:

- 
1. Kadar air : 13% (maksimal)
 2. Protein : 13-15%
 3. Lemak : 3% (minimal)
 4. Serat : 8% (maksimal)
 5. Abu : 6% (maksimal)
 6. Kalsium : 0,8% (minimal)
 7. Fosfor : 0,6% (minimal)

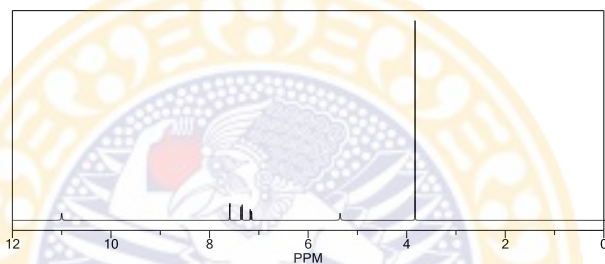
Bahan-bahan yang dipakai bersal dari jagung, dedak, tepung ikan, bungkil kedelai, bungkil kelapa, tepung daging dan tulang, pecahan gandum, bungkil kacang tanah, canola, tepung daun, vitamin kalium, fosfat, dan trace mineral.

LAMPIRAN 8

1. Prediksi H-NMR Senyawa Asam 5-metoksi salisilat



Estimation quality is indicated by color: good, medium, rough



Protocol of the H-1 NMR Prediction:

Node	Shift	Base + Inc.	Comment (ppm rel. to TMS)
OH	5.35	5.00	aromatic C-OH
		0.35	general corrections
OH	11.0	11.00	carboxylic acid
CH	7.59	7.26	1-benzene
		-0.49	1 -O-C
		-0.17	1 -O
		0.87	1 -C(=O)O
		0.12	general corrections
CH	7.16	7.26	1-benzene
		-0.49	1 -O-C
		-0.17	1 -O
		0.34	1 -C(=O)O
		0.22	general corrections
CH	7.35	7.26	1-benzene
		-0.11	1 -O-C
		-0.53	1 -O
		0.21	1 -C(=O)O
		0.52	general corrections
CH3	3.83	0.86	methyl
		2.87	1 alpha -O-1;C*C*C*C*C*1
		0.10	general corrections

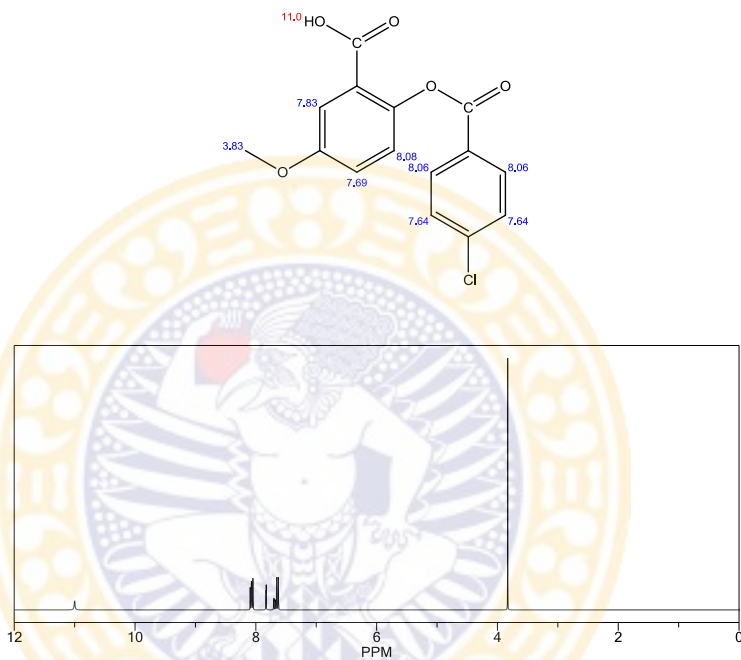
1H NMR Coupling Constant Prediction

shift atom index coupling partner, constant and vector

5.35	7			
11.0	10			
7.59	1			
		3	1.5	H-C*C-C-H
7.16	3			
		4	7.5	H-C*C-H
		1	1.5	H-C*C-C-H
7.35	4			
		3	7.5	H-C*C-H
3.83	12			

2. Prediksi H-NMR Senyawa Asam 2-(4-Klorobenzoiloksi)-5-metoksi-benzoat dengan *Chem-Draw*

ChemNMR ^1H Estimation



Protocol of the H-1 NMR Prediction:

Node	Shift	Base + Inc.	Comment (ppm rel. to TMS)
OH	11,0	11,00	carboxylic acid
CH	7,64	7,26	1-benzene
		0,01	1 -Cl
		0,15	1 -C(=O)O-1:C*C*C*C*C*C*1
		0,22	general corrections
CH	7,83	7,26	1-benzene
		0,07	1 -OC(=O)-1:C*C*C*C*C*C*1
		-0,49	1 -O-C
		0,87	1 -C(=O)O
		0,12	general corrections
CH	8,06	7,26	1-benzene
		-0,06	1 -Cl
		0,88	1 -C(=O)O-1:C*C*C*C*C*C*1
		-0,02	general corrections
CH	7,64	7,26	1-benzene
		0,01	1 -Cl
		0,15	1 -C(=O)O-1:C*C*C*C*C*C*1
		0,22	general corrections
CH	8,08	7,26	1-benzene
		-0,11	1 -OC(=O)-1:C*C*C*C*C*C*1
		-0,11	1 -O-C
		0,21	1 -C(=O)O
		0,83	general corrections
CH	7,69	7,26	1-benzene
		0,07	1 -OC(=O)-1:C*C*C*C*C*C*1
		-0,49	1 -O-C
		0,34	1 -C(=O)O
		0,51	general corrections
CH	8,06	7,26	1-benzene
		-0,06	1 -Cl
		0,88	1 -C(=O)O-1:C*C*C*C*C*C*1
		-0,02	general corrections
CH3	3,83	0,86	methyl
		2,87	1 alpha -O-1:C*C*C*C*C*C*1
		0,10	general corrections

1H NMR Coupling Constant Prediction

shift	atom index	coupling partner.	constant and vector
11,0	8		
7,64	15		
		14	7,5 H-C*C-C-H
		17	1,5 H-C*C*C-C-H
7,83	1		
		3	1,5 H-C*C*C-C-H
8,06	14		
		15	7,5 H-C*C-C-H
		18	1,5 H-C*C*C-C-H
7,64	17		
		18	7,5 H-C*C-C-H
		15	1,5 H-C*C*C-C-H
8,08	4		
		3	7,5 H-C*C-C-H
7,69	3		
		4	7,5 H-C*C-C-H
		1	1,5 H-C*C*C-C-H
8,06	18		
		17	7,5 H-C*C-C-H
		14	1,5 H-C*C*C-C-H
3,83	21		

LAMPIRAN 9

SERTIFIKAT KODE ETIK PENELITIAN



KOMISI ETIK PENELITIAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
Animal Care and Use Committee (ACUC)

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
 "ETHICAL CLEARANCE"

No : 573-KE

KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
 FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA,
 TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
 DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA :

PENELITIAN BERJUDUL : Sintesis Senyawa Asam 2-(4-Klorobenzoiloksi)-5-Metoksi Benzoat dari Uji Aktivitas Analgesiknya Pada Mencit (*Mus musculus*)

PENELITI UTAMA : Fauziah Rahmawati

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT PENELITIAN : Program Studi S1 Farmasi
 Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Surabaya, 18 Mei 2018



Prof. Dr. H. Srianto, M.Kes.Drh.
 NIP. 19551051988011001



Nurdianto Triakson, M.P.,Dh.
 NIP. 196805051997021001